



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ microRNAs»**

**Στεργίου Στέργιος**

**Ιατρός - Ειδικευόμενος Παθολογικής Ανατομικής**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**κα ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**(Επιβλέπουσα)**

**κα ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ**  
**ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)**

**κος ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ**  
**ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)**

**ΛΑΡΙΣΑ, ΕΤΟΣ 2018**

**~ 1 ~**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«microRNAs in BREAST CANCER»**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1 - ΜΑΣΤΟΣ	10
1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ	10
1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ	11
1.2.α Γενικά	11
1.2.β Ο ανενεργός μαστικός αδένας	11
1.2.γ Ο ενεργός μαστικός αδένας	12
1.2.δ Θηλή και θηλαία άλω	13
1.3 Φυσιολογία μαστικού αδένος - ορμονικές επιδράσεις	13
2 - ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	14
2.1 Ηλικια εμφάνιση της νόσου	14
2.2 Επιδημιολογικά δεδομένα	14
2.3 Παράγοντες κινδύνου	15
2.3.α Οικογενειακό ιστορικό	15
2.3.β Αναπαραγωγικό ιστορικό	15
2.4 Γενετική Προδιάθεση	16
2.5 Εντόπιση	17
2.6 Διάγνωση της νόσου	18
2.6.1 Κλινική εξέταση	18
2.6.2 Μαστογραφία	19
2.6.3 Κυτταρολογικές τεχνικές	19
2.6.4 Βιοψία Βελόνης - Needle core biopsy	21
2.7 Μικροσκοπική ταξινόμηση καρκίνων του μαστού	22
2.8 - Μεταλλάξεις και επιγενετική στον καρκίνο του μαστού	25
2.8.1 - Γενετικές μεταλλάξεις και καρκίνος του μαστού	25
2.8.1.1 - BRCA1	25
2.8.1.2 BRCA2	25
2.8.1.3 Γονίδια που πιθανώς σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού	27
2.8.1.4 Μονονουκλεοτιδική πολυμορφισμοί (SNPs) και καρκίνος του μαστού	29

2.8.2	Επι γενετική καρκίνου του μαστού	30
2.8.2.1	Εισαγωγή	30
2.8.2.2	Ημεθύλιωση του DNA	30
2.8.2.3	Μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ιστών	31
2.8.2.4	Επι γενετικές αλλαγές και μικρο-περιβάλλον του όγκου στον καρκίνο του μαστού	32
3	-microRNAs	33
3.1	Εισαγωγή	33
3.2	MiRNA βιογένεση και ωρίμανση	33
3.3	Ρύθμιση των μορίων miRNAs από ανταγωνιστικά (competing) ενδογενή RNAs (ceRNAs)	35
3.4	Μέθοδοι ανίχνευσης κυκλοφορούντων μορίων miRNA	36
3.5	Επιλογή δείγματος και επεξεργασία	37
4	- Ορόλος των miRNAs στον καρκίνο του μαστού	37
4.1	miRNAs και ορόσημα στον καρκίνο του μαστού	40
4.1.1	Σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού και αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο	40
4.1.2	Διήθηση και μετάσταση	41
4.1.3	Αγγειογένεση	41
4.1.4	Αθανασία αναπαραγωγικού τύπου (replicative immortality)	42
4.1.5	Κυτταρικός μεταβολισμός (energetics)	43
4.1.6	Ανοσική απάντηση - καρκίνος του μαστού	44
4.1.7	Γενωμική αστάθεια και μεταλλάξεις	44
4.1.8	Προαγωγή της φλεγμονής από τα κύτταρα του όγκου	45
4.1.9	Φαινότυπος βλαστικών κυττάρων	45
4.2	Τα κυκλοφορούντα miRNAs ως βιοδείκτες	46
4.3	Τα κυκλοφορούντα miRNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες	47
4.4	Τα κυκλοφορούντα miRNAs ως προγνωστικοί βιοδείκτες	56
4.5	Τα κυκλοφορούντα miRNAs ως (predictive) προβλεπτικοί βιοδείκτες	61
4.6	Περιορισμοί στη χρήση των miRNAs ως βιοδεικτών στον καρκίνο του μαστού	63
5	- Ανίχνευση κυκλοφορούντων exo-miRNAs (exosomal-miRNAs) διαγνωστική και θεραπευτική χρήση τους	67

5.1 Κυκλοφορούντα exo-miRNAs σε ορό και πλάσμα για πρώτη φορά	67
5.2 Τα κυκλοφορούντα exo-miRNAs για την παρακολούθηση του βαθμού ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία τους	69
5.3 Περιορισμοί, προκλήσεις και ευκαιρίες για διαγνωστικού τύπου κλινικές εφαρμογές	69
5.4 Λειτουργίες των exo-miRNAs και οι θεραπευτικές τους εφαρμογές	70
5.5 Exo-miRNAs προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα και αντίσταση στην ορμονο-θεραπεία	71
5.6 Exo-miRNAs προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα και αντίσταση στη χημειοθεραπεία	72
5.7 Exo-miRNAs προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα ευνοούν τη διείσδυση και την εμφάνιση μεταστάσεων	73
5.8 Ρύθμιση της αγγειογένεσης από εξοσώματα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα και μεσεγχυματικά stemcells	75
5.9 Τα exo-miRNAs προερχόμενα από στρωματικά κύτταρα τροποποιούν τις ιδιότητες των ομοίων με stemcells καρκινικών κυττάρων (cancerstemcelllike)	76
5.10 Η ρύθμιση της αδράνειας (dormancy) των καρκινικών κυττάρων από Exo-miRNAs προερχόμενα από στρωματικά κύτταρα	77
6 - Ορόλος των miRNAs στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού σε σχέση με BRCA1 μεταλλάξεις	81
6.1 Εισαγωγή	81
6.2 Θεραπεία βασισμένη σε σκευάσματα πλατίνας (platinum)	81
6.3 Θεραπεία βασισμένη σε PARP1 παρεμποδιστές και miRNAs <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>	85
7 - Παραδείγματα κλινικών δοκιμών miRNAs στον καρκίνο του μαστού	90
8 - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93

Στην ιερή μνήμη του γέροντα μου, Σεβασμιωτάτου Μητροπολίτου Λαρίσης και  
Τυρνάβου μακαριστού κυρού Ιγνατίου

"Μάθε, πως στη ζωή φάροι στέκουν και οδηγοί αυτοί που άφησαν τη γη"

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ακόμη και σήμερα ο καρκίνος του μαστού παραμένει ο πλέον συχνός και με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα τύπος καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως. Μετά την ανακάλυψη των miRNAs πριν από 15 χρόνια, δεκάδες ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν να διαπιστώσουν το ρόλο τους στην ογκογένεση στον καρκίνο του μαστού και επιδίωξαν να αναπτύξουν κλινικές εφαρμογές για τα μικρά, μη κωδικά αυτά ρυθμιστικά RNAs.

Η βιβλιογραφία των προηγούμενων ετών έχει δείξει την εν δυνάμει χρήση στον καρκίνο του μαστού των κυκλοφορούντων στο περιφερικό αίμα νουκλεϊκών οξέων στη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Μεταξύ αυτών, τα κυκλοφορούντα miRNAs αποτελούν πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες, λαμβάνοντας υπόψη την ευκολία απομόνωσης τους, τη δομική τους σταθερότητα ως μόρια (υπό διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας και απομόνωσης του δείγματος).

Επιπλέον, η πρόσφατη έρευνα στη διακυτταρική επικοινωνία, μέσω εξοσωμάτων, έδειξε ότι τα miRNAs φαίνεται ότι προτιμώνται ως φορτίο από τα εξοσώματα για τη μετάδοση βιολογικών ιδιοτήτων στα κύτταρα - στόχους τους. Διαγνωστικά τα κυκλοφορούντα exo-miRNAs μπορούν να απεικονίσουν το περιεχόμενο των κυττάρων του καρκίνου του μαστού και/ ή τις αντιδράσεις που παρουσιάζει το μικροπεριβάλλον του όγκου στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ η ανάλυση σε ορό ή πλάσμα των κυκλοφορούντων miRNAs μπορεί να φανεί χρήσιμη για πρόωπη διάγνωση της νόσου ή για παρακολούθηση στην ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία και εξέλιξη της νόσου.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζουμε την πρόσφατη γνώση που αφορά στη λειτουργία και βιογένεση των miRNAs (και exo-miRNAs) και αναφερόμαστε στα πλεονεκτήματα, περιορισμούς και ενδεχόμενες παγίδες που μπορεί να εμφανιστούν κατά τη χρήση των κυκλοφορούντων miRNAs - exomiRNAs ως προγνωστικοί και διαγνωστικοί βιοδείκτες στη διαχείριση του καρκίνου του μαστού.

Τέλος, παρουσιάζουμε τον εν δυνάμει ρόλο των miRNAs στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού στα πλαίσια ευρέσεως μιας εναλλακτικής και αποτελεσματικής μεθόδου για τη θεραπεία ή ακόμη και την πλήρη ίαση της εν δυνάμει αποτρέψιμης αυτής νόσου.

## **ABSTRACT**

Breast cancer still remains, the most common and with the highest mortality rate, form of cancer in women around the world. After the discovery of miRNAs over 15 years ago, several of research groups sought to discover how they participate in breast cancer tumorigenesis and also tried to develop clinical applications in breast cancer for these short, noncoding, regulatory mRNAs.

Accumulating evidence in the past several years has proven the potential use of peripheral blood circulating nucleic acids in breast cancer diagnosis, prognosis and for monitoring response to anticancer therapy. Among these, circulating miRNAs are recognised as promising biomarkers, give the ease with which miRNAs can be isolated and their structural stability (under different conditions of sample processing and isolation).

Furthermore, recent research on cell-to-cell communication via exosomes has shown that miRNA appear to be a preferential cargo of exosomes in mediating biological effects in recipient cells. From a diagnostic perspective, circulative exo-miRNAs may represent breast cancer cell content and/ or tumor microenviromental reactions to cancer cell growth.. Thus, serum or plasma analysis of circulative exo-miRNAs could be useful for early disease detection or for monitoring treatment response and disease progression.

In this essay, we provide current state-of-the-art of miRNAs (also of exo-miRNAs) biogenesis and function, as well as we discuss the advantages, limitations and pitfalls of using circulating miRNAs -exomiRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer management. Additionally, we discuss the potential role of miRNAs in breast cancer treatment. Our goal is to help find an alternative and effective way to treat or even cure this preventable disease.

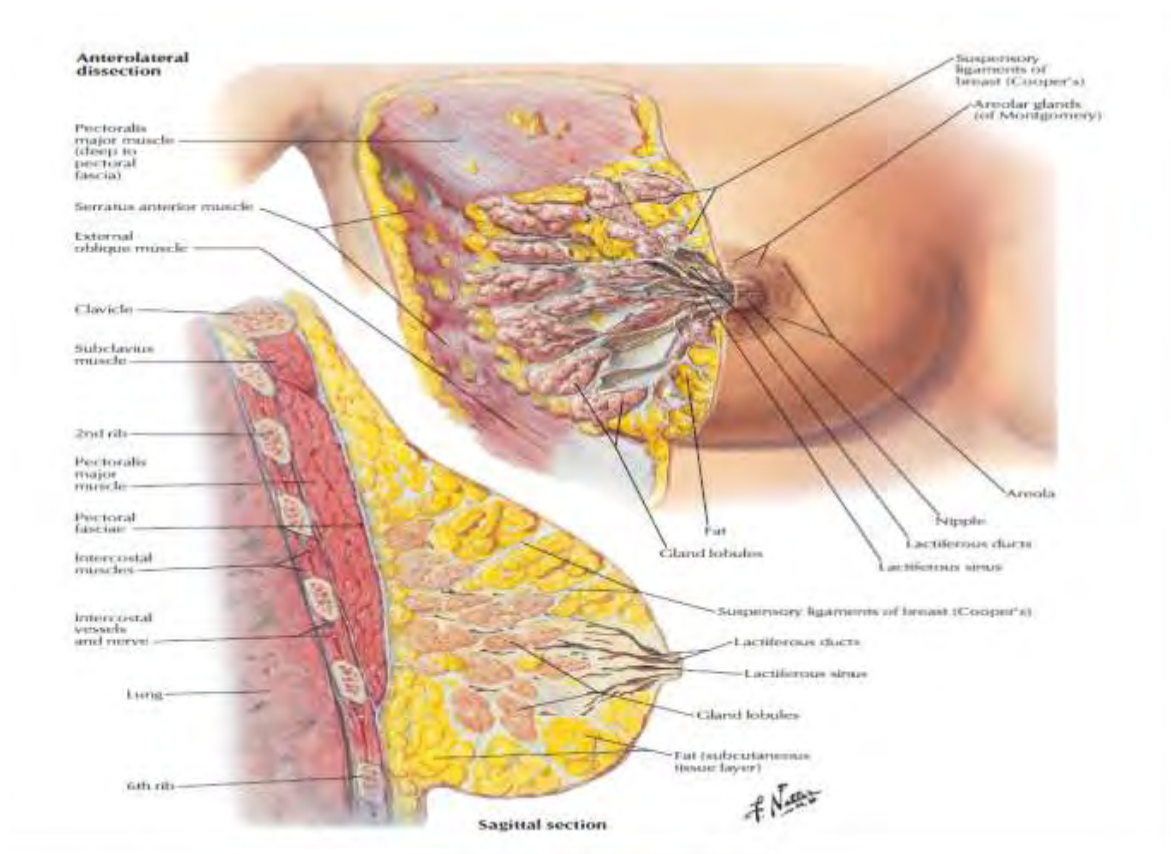




## 1 - ΜΑΣΤΟΣ

### 1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Ο μαστός αποτελείται από το μαστικό αδένα, το υποδόριο λίπος και το αντίστοιχο δέρμα και παρουσιάζεται σαν ημισφαιρική (ελαφρά παραμορφωμένη) προβολή του πρόσθιου θωρακικού τοιχώματος. Η προβολή αυτή εκτείνεται μεταξύ στέρνου και μασχάλης από την 3η μέχρι την 7η πλευρά. Οι μαστοί είναι κινητοί στο θωρακικό τοίχωμα επί της περιτονίας του μείζονος θωρακικού μυός, και συμμετρικοί στο σχήμα και στη θέση τους. Συχνά φέρεται προς τη μασχάλη επέκταση του μαστικού αδένα, η μασχαλιαία απόφυση. η αύλακα μεταξύ των δύο μαστών καλείται μεσομάστιος κόλπος. Η θηλή του μαστού είναι κυλινδρική ή κωνική προβολή ύψους 10-12 mm που αντιστοιχεί περίπου κάτω από το κέντρο του μαστού. Στην κορυφή της εμφανίζει 15-20 τρήματα με τα οποία εκβάλλουν οι γαλακτοφόροι πόροι του αδένα. Η θηλή περιβάλλεται από τη θηλαία άλω. Θηλή και θηλαία άλως έχουν διαφορετική-βαθύτερη χροιά από το υπόλοιπο δέρμα ιδιαίτερα κατόπιν τοκετών ή κατά τη διάρκεια κύησης. Η θηλαία άλως εμφανίζει 10-15 μικρά επάρματα -αδένες της άλω ή αδένες του Montgomery- (1) (Εικόνα 1)



Εικόνα 1: Αδρή ανατομία μαστού (Atlas of Human Anatomy 6th Edition - Frank H. Netter - plate 179)

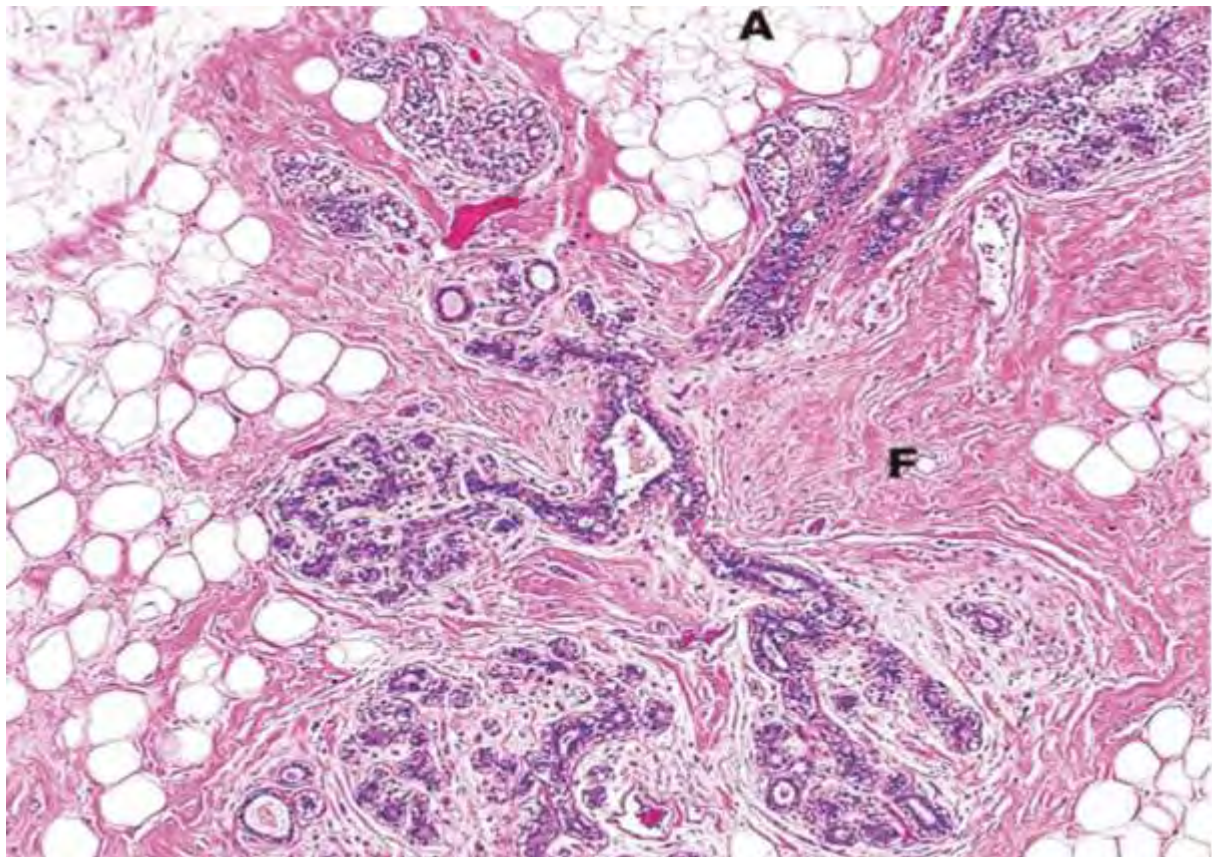
## **1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ**

### **1.2.α Γενικά**

Οι μαστικοί αδένες, εντόνως τροποποιημένοι ιδρωτοποιοί αδένες, δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ αρρένων και θήλεων ατόμων μέχρι την έναρξη της ήβης, οπότε υπό την επίδραση ορμονών οι μαστοί του θήλεος αναπτύσσονται. Ο μαστός αποτελείται από πολυάριθμους ανεξάρτητους σύνθετους αδένες καθένας από τους οποίους θεωρείται ότι αποτελεί το αδενικό στοιχείο ενός λοβού και αποχετεύεται από γαλακτοφόρο πόρο, ο οποίος διοχετεύει το έκκριμα του στην επιφάνεια της θηλής.(2,3)

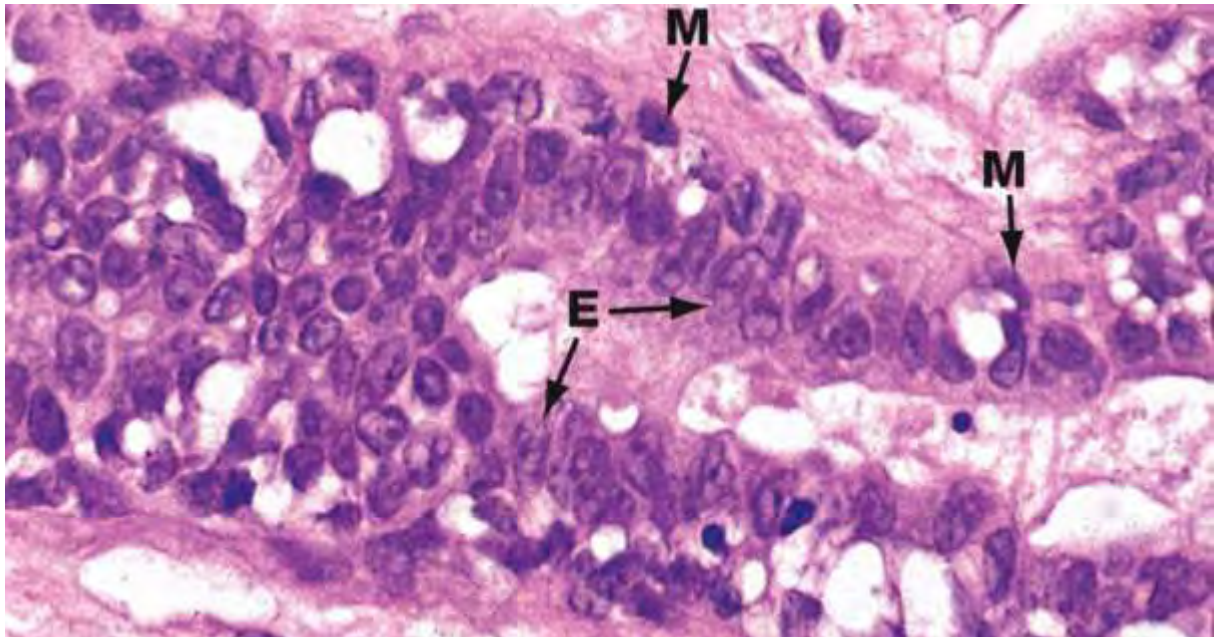
### **1.2.β Ο ανενεργός μαστικός αδένας**

Ο ανενεργός αδένας αποτελείται κυρίως από πυκνό ακανόνιστο συνδετικό ιστό με διάσπαρτα λόβια λιπώδους ιστού και πολυάριθμους εκφορητικούς πόρους. Συχνά στα τυφλώς απολήγοντα άκρα των εκφορητικών πόρων υπάρχουν εκβλαστήσεις αδενοκυψελίδων και συνοδών μυοεπιθηλιακών κυττάρων.(2,3) (Εικόνα 2-3)





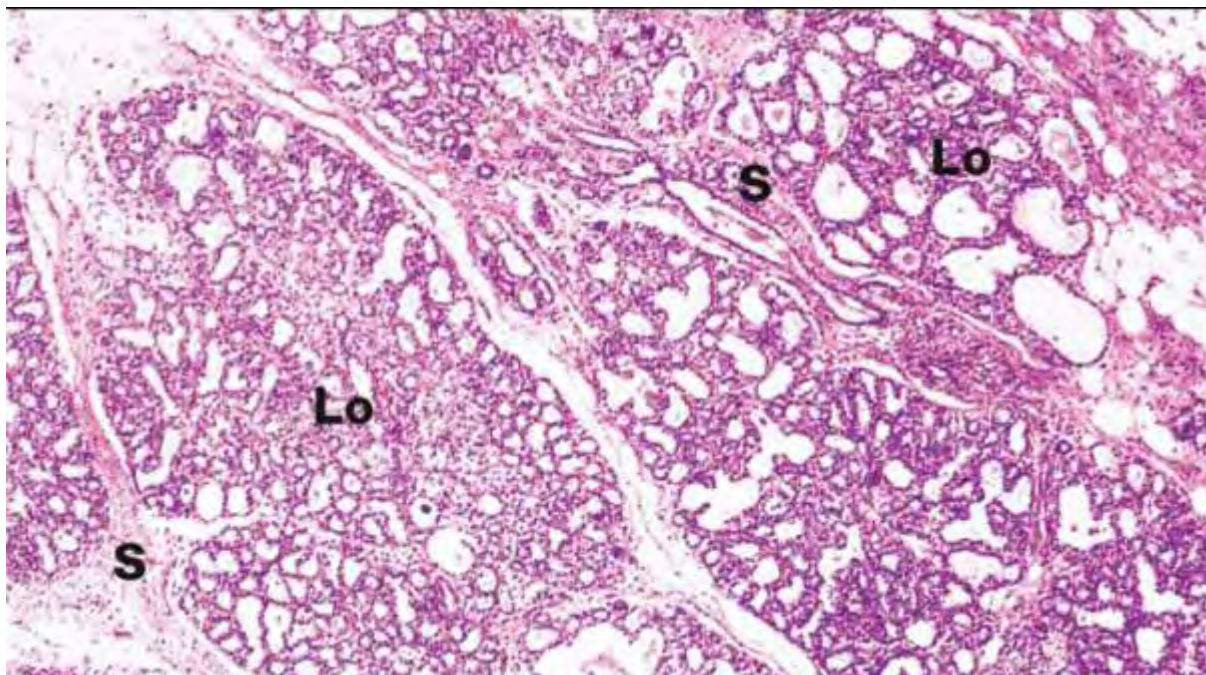
Εικόνα 2:Ανενεργός μαζικός αδένας: διακρίνονται τελικοί πόροι - αδενικά λόβια του μαζικού αδένος σε μικρή μεγέθυνση (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης). Το εκτεταμένο δίκτυο πόρων και αδενίων περιβάλλονται από πυκνό κολλαγόνο συνδετικό ιστό **A** και από λιπώδη ιστό **F** (Wheater's Functional Histology - κεφάλαιο: The Breast - page 379).



Εικόνα 3:Ανενεργός μαζικός αδένας: (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης). οι πόροι και τα λόβια του μαζικού αδένος επενδύονται από δύο στιβάδες κυττάρων από την στιβάδα που βλέπει προς τον αυλό των επιθηλιακών κυττάρων **E** και τη βασική στιβάδα την οποία συνιστούν τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα **M**(Wheater's Functional Histology - κεφάλαιο: The Breast - page 379).

### **1.2.γ Ο ενεργός μαστικός αδένας**

Ο μαστικός αδένας καθίσταται ενεργός κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας. Οι διευρυμένες αδενοκύψελες, που σχηματίζουν πολυάριθμα λόβια, αποτελούνται από μονόστιβο κυβικό επιθήλιο, γεγονός που τις κάνει να μοιάζουν ιστολογικά με το θυρεοειδή αδένος. Εντούτοις, η παρουσία εκφορητικών πόρων και μυοεπιθηλιακών κυττάρων εξασφαλίζει τα απαραίτητα χαρακτηριστικά γνωρίσματα. Οι αδενοκύψελες και ο αυλός των πόρων είναι δυνατόν να περιέχουν λιπώδες έκκριμα.(2,3) (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Ενεργός μαζικός αδένας: (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης) υπό ορμονική επίδραση τα λόβια **Lo** του μαζικού αδένος έχουν μεγεθυνθεί σημαντικά εις βάρους του διαλοβιακού διάμεσου συνδετικού και λιπώδους ιστού. **S:** διαλοβιακά διαφραγμάτια (Wheater's Functional Histology - κεφάλαιο The Breast - page 380).

#### **1.2.δ Θηλή και θηλαία άλως**

Η θηλαία άλως αποτελείται από λεπτή, μελαγχρωματική επιδερμίδα, η οποία και φέρει ευμεγέθεις θηλαίους αδένες αποκρινούς τύπου. Ανευρίσκονται επίσης κατά τις διατομές ιδρωτοποιοί και σμηγματογόνοι αδένες. Το χόριο φέρει πολυάριθμες λείες μυϊκές ίνες. Η θηλή παρουσιάζει μερικά μικρά στόμια, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα περιφερικά άκρα των γαλακτοφόρων πόρων. Οι εν λόγω πόροι εκφύονται από γαλακτοφόρου κόλπους, οι οποίοι και αποτελούν διευρυμένοι χώροι που εντοπίζονται στη βάση της θηλής. Η επιδερμίδα που καλύπτει τη θηλή είναι λεπτή, ενώ το χόριο είναι πλούσιο σε λείες μυϊκές ίνες και νευρικές απολήξεις. Αν και η θηλή δεν διαθέτει τριχοθυλάκια ή ιδρωτοποιούς αδένες, φέρει άφθονους σμηγματογόνους αδένες.(2,3)

#### **1.3 Φυσιολογία μαστικού αδένος - ορμονικές επιδράσεις**

Κατά τη διάρκεια της κύησης, μερικές ορμόνες αλληλεπιδρούν και προάγουν την ανάπτυξη των εκκριτικών μονάδων του μαστικού αδένος. Οι τελικοί μεσοκυψελιτικοί πόροι είναι εκείνοι που πολλαπλασιάζονται, σχηματίζοντας εκκριτικές αδενοκυψέλες. Οι ορμόνες που λαμβάνουν μέρος είναι η προγεστερόνη, τα οιστρογόνα και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη που εκκρίνονται από τον πλακούντα και η προλακτίνη ( η γαλακτοφόρος

ορμόνη) η ποία και εκκρίνεται από τα οξέοφιλα κύτταρα της αδενούποφησης, η έκκριση της οποίας αυξάνει σημαντικά κατά τη διάρκεια του δεύτερου μισού του καταμήνιου κύκλου και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Οι αδενοκυψέλες και οι τελικοί μεσοκυψελιδικοί πόροι περιβάλλονται από μυοεπιθηλιακά κύτταρα, τα οποία συστέλλονται υπό την επίδραση της ωκυτοκίνης (η οποία και παράγεται από τη νευροϋπόφηση ως απάντηση στο θηλασμό) εξωθώντας το γάλα από το μαστό - αντανakλαστικό εξωθήσεως του γάλακτος. Όταν δε η μητέρα διακόψει το θηλασμό, τότε τα επίπεδα της προλακτίνης πέφτουν, οδηγώντας τελικά σε ταχύτατη παύση της παραγωγής γάλακτος.(2,4)

## **2 -ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

### **2.1 Ηλικία εμφάνισης της νόσου**

Η μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκινογένεσης του μαστού διαγιγνώσκονται κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας (αναφερόμαστε στο γυναικείο πληθυσμό όπου και η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων). Με βάσει τις καμπύλες επίπτωσης της νόσου διαπιστώνεται ότι τα πρώτα, λίγα σε αριθμό περιστατικά, διαγιγνώσκονται στην εφηβεία ενώ εμφανίζουν σημαντική αύξηση (peak) μέχρι και την εμμηνόπαυση. Ωστόσο δεν πρέπει να διαφεύγει της προσοχής μας ότι η νόσος μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, από την παιδική έως και το γήρας. (95)

### **2.2 Επιδημιολογικά δεδομένα**

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πλέον συχνός κακοήθης όγκος και η κυριότερη αιτία θανάτου από κακοήθεια στον γυναικείο πληθυσμό, με περισσότερες από 1.000.000 περιπτώσεις παγκοσμίως ανά έτος (98). Στις ΗΠΑ, περίπου 100.000 νέες περιπτώσεις καρκινογένεσης του μαστού διαγιγνώσκονται κάθε έτος, ενώ 30.000 είναι περίπου οι ασθενείς που πεθαίνουν ετησίως. Η επίπτωση του νοσήματος είναι υψηλή στη Βόρεια Αμερική και Βόρεια Ευρώπη ( 91,4 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες ετησίως), ενδιάμεση στη Νότια Ευρώπη και λατινική Αμερική, ενώ στις χώρες της Αφρικής και Ασίας η επίπτωση του νοσήματος χαρακτηρίζεται χαμηλή, παρόλο που τα τελευταία έτη παρατηρείται μία σχετική αύξηση των νέων περιστατικών. Η εισαγωγή και εξάπλωση των σύγχρονων τεχνικών απεικόνισης (μαστογραφία) σε συνδυασμό με την καθιέρωση σε μεγάλη κλίμακα προγραμμάτων προληπτικού ελέγχου (screening test), ιδιαίτερα στις ΗΠΑ, συνέβαλλε στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού σε πρώιμα στάδια (100). Όμως η εξέλιξη

αυτή δεν έχει αποτυπωθεί ακόμη με μία θεαματική βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών. Στην πραγματικότητα, με βάσει τα στατιστικά δεδομένα, η θνησιμότητα έχει ελάχιστα βελτιωθεί από το 1930 έως το 1990 (95). Ωστόσο, σε περιοχές όπως Αυστραλία, Βόρεια Αμερική και Δυτική Ευρώπη, η θνησιμότητα έχει μειωθεί σημαντικά, εξαιτίας του συνδυασμού των σύγχρονων διαγνωστικών τεχνικών και των νέων θεραπειών (96,99). Δυστυχώς όμως για χώρες όπως η Ιαπωνία, η Κόστα Ρίκα και η Σιγκαπούρη, η θνησιμότητα έχει επιδεινωθεί (97). Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα δεδομένα από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO – 2014), η επίπτωση του καρκίνου του μαστού δεν μπορεί να υπολογιστεί ικανοποιητικά λόγω ελλειπών στοιχείων. Από τα στοιχεία που ανασύρουμε από τη GLOBOCAN (2012), φαίνεται ότι η επίπτωση του νοσήματος στην Ελλάδα προσδιορίζεται στο 43,9 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες, ενώ η θνησιμότητα στο 14,1 (ανά 100.000) (5).

## **2.3 Παράγοντες κινδύνου**

Αρκετοί παράγοντες κινδύνου έχουν προταθεί ως υπεύθυνοι για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, ενώ πολλοί άλλοι παραμένουν ακόμη υπό αμφισβήτηση και διερεύνηση. Έχει προταθεί ότι κοινός παρονομαστής των περισσότερων από τους παράγοντες κινδύνους είναι μία ισχυρή ή/και παρατεταμένης διάρκειας οιστρογονική διέγερση σε ασθενείς με ορισμένο γενετικό υπόβαθρο.(112, 102)

### **2.3.α Οικογενειακό ιστορικό**

Εκτός της γεωγραφικής προέλευσης που προαναφέρθηκε, το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Γυναίκες οι οποίες έχουν συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού αντιμετωπίζουν 2-3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο από το γενικό πληθυσμό να αναπτύξουν τη νόσο, με τον κίνδυνο αυτό να είναι ακόμη μεγαλύτερος εάν ο συγγενής πρώτου βαθμού εμφάνισε τη νόσο σε μικρή ηλικία ή παρουσίασε αμφοτερόπλευρο καρκίνο του μαστού.(121)

### **2.3.β Αναπαραγωγικό ιστορικό**

Αυξημένος κίνδυνος επίσης έχει συσχετιστεί με πρόωμη εμμηναρχή, εμμηνόπαυση σε μεγάλη ηλικία, και τεκνοποίηση σε μεγάλη ηλικία.(111,113) Ο καρκίνος του μαστού είναι σπάνιος σε γυναίκες που έχουν ευνουχιστεί, η ωοθηκεκτομή πριν την ηλικία των 35 ετών φαίνεται ότι μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου κατά το 1/3. Οι γυναίκες που τεκνοποιούν για

πρώτη φορά στην ηλικία των 18 ετών αντιμετωπίζουν το 1/3 του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού συγκριτικά με τις οι γυναίκες οι οποίες τεκνοποιούν για πρώτη φορά μέχρι την ηλικία των 30 ετών (123). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης, ότι μόνο προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με φυσιολογική γαλουχία φαίνεται να παρουσιάζουν μικρότερο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου (113). Επιπλέον, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξάνεται σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οποίες παρουσιάζουν στο πλάσμα αίματος τους αυξημένες συγκεντρώσεις ανδρογόνων ορμονών (110).

Ινοκυστική νόσος και επιθηλιακή υπερπλασία: Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πρώιμων αυτών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (101).

Εξωγενώς χορηγούμενα οιστρογόνα: Παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει ότι γυναίκες με ινοκυστική νόσο του μαστικού αδένα παρουσίαζαν αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού από 2 έως και σε κάποιες μελέτες 9 φορές συχνότερα (109). Πρόσφατη μελέτη κοόρτης έδειξε οι γυναίκες που έλαβαν θεραπεία με ορμονική αντικατάσταση εμφάνισαν συχνότερα τη νόσο συγκριτικά με τις γυναίκες που έλαβαν οιστρογόνα (116,117). Συγκεκριμένα νέες μελέτες κατέδειξαν ότι οι γυναίκες υπό θεραπεία με ορμονική αντικατάσταση ανέπτυξαν το λοβιακό τύπο του καρκινώματος του μαστού (105, 106).

Αντισυλληπτικά δισκία: Πολλαπλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει μια σχεδόν αμελητέα αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες που ελάμβαναν αντισυλληπτικά συγκριτικά με τις ομάδες control (115,116,117).

Ιονίζουσα ακτινοβολία: Αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου παρατηρήθηκε στο γυναικείο πληθυσμό που εκτέθηκε σε ακτινοβολία ειδικά όταν αυτό έλαβε χώρα κατά τη φάση ανάπτυξης του αδένα(107,108,119,120).

Πλαστικές επεμβάσεις: Η εμφάνιση καρκίνου του μαστού - κυρίως ενδοπορικού (in situ) καρκίνου του μαστού - φαίνεται ότι συσχετίζεται με επεμβάσεις αυξητικής στήθους. Ωστόσο, πρόσφατη επαναξιολόγηση των δεδομένων παλαιότερων μελετών, καθώς και νέες μελέτης κοόρτης έδειξαν ότι ο κίνδυνος καρκινογένεσης ήταν σχεδόν ίδιος με αυτόν του γενικού πληθυσμού (103, 104).

Άλλοι παράγοντες : Φαίνεται ότι ασθενείς με σύνδρομο Cowden ή αταξία-τηλεαγγειεκτασία παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (118, 121).

## **2.4 Γενετική Προδιάθεση**

Περίπου το 5-10% του συνόλου των καρκινωμάτων του μαστικού αδένα είναι οικογενή. Σημαντικό γεγονός στη μελέτη του καρκίνου του μαστού ήταν η ανακάλυψη δύο υψηλής



διδυστικότητα - ευαισθησίας γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (καθώς και με άλλες νεοπλασίες κυρίως με τον καρκίνο των ωοθηκών) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του φορέα των εν λόγω γονιδίων (138). Αρχικά, θεωρείτο ότι τα εν λόγω γονίδια σχετίζονταν με τη συντριπτική πλειοψηφία των καρκινωμάτων του μαστού, όμως πρόσφατα δεδομένα έχουν αποδείξει ότι μόλις το 16% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού οφείλεται σε μεταλλαγμένα αλληλόμορφα των γονιδίων αυτών (124,131,136). Τα γονίδια αυτά είναι το BRCA1 και BRCA2 τα οποία εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 17 (17q21) και 13 (13q12.3) αντίστοιχα (137,127). Μεταλλάξεις των συγκεκριμένων γονιδίων εντοπίζονται στο 2% περίπου των Εβραίων Εσκενάζυ, ενώ έχει υπολογιστεί ότι οι φορείς αντιμετωπίζουν κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε ποσοστό 60-70% μέχρι και την ηλικία των 70 ετών (129,135). Ο εντοπισμός κατόπιν γενετικού ελέγχου μετάλλαξης στα συγκεκριμένα γονίδια παρέχει τη δυνατότητα στους φορείς να επιλέξουν μεταξύ αυστηρής ιατρικής παρακολούθησης και προφυλακτική μαστεκτομή άμφω ή χημειοθεραπείας (132,133).

Η πρωτεΐνη, προϊόν της έκφρασης του γονιδίου BRCA1, συμβάλλει σε πλήθος κυτταρικών λειτουργιών όπως η επιδιόρθωση του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, ο έλεγχος των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints), η ουμπικουιλίνωση και ο ανασυνδυασμός του DNA (remodeling) (128,134,136). Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη-προϊόν της έκφρασης του γονιδίου BRCA2 είναι υπεύθυνη για σημαντικές λειτουργίες όπως η επιδιόρθωση του DNA (μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού), η κυτταροκίνηση και η μείωση.

Ανάλυση καρκινωμάτων του μαστού σε φορείς μεταλλαγμένων αλληλομόρφων για το BRCA1 γονίδιο έδειξε ότι αναπτύσσουν νεοπλάσματα με μυελώδη κυτταρικά χαρακτηριστικά, με υψηλό βαθμό κακοήθειας, με υψηλό αριθμό πυρηνοκινήσιων - μιτωτικό δείκτη, με συγκυτιακό πρότυπο ανάπτυξης, με μεγάλης έκτασης νέκρωση, ενώ συχνά είναι τριπλά αρνητικοί όσον αφορά την έκφραση οιστρογονικών, προγεστερονικών υποδοχέων και του *cerb2* (130,136). Αντίθετα, οι φορείς μεταλλαγμένων αλληλομόρφων για το γονίδιο BRCA2 δεν παρουσιάζουν ορισμένου ιστολογικού τύπου καρκίνο του μαστού, ενώ τα νεοπλασματικά κυτταρικά στοιχεία τους είναι συνήθως θετικά στους ορμονικούς υποδοχείς (126,130).

## **2.5 Εντόπιση**

Περίπου το 50% των καρκινωμάτων του μαστού εντοπίζονται στο άνω έξω τεταρτημόριο, το 15% στο άνω έσω, το 10% στο κάτω έξω, το 5% στο κάτω έσω τεταρτημόριο, το 17% έχει κεντρική εντόπιση, ενώ μόλις το 3% είναι διάχυτο ή πολυεστιακό. Η αξιοσημείωτη αυτή διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του μαστού δικαιολογείται εάν λάβουμε

υπόψη μας τη μάζα του μαζικού παρεγχύματος που εντοπίζεται σε κάθε τεταρτημόριο. Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει ένα ακόμη ιδιόμορφο στοιχείο ότι ο καρκίνος του μαστού προσβάλλει συνηθέστερα τον αριστερό μαστό συγκριτικά με το δεξιό (σε ποσοστό μέχρι και 13%) (139).

Επιπλέον, η πιθανότητα ασθενής με καρκίνο του μαστού να εμφανίσει κακοήγη νεοπλασία και στον έτερο μαζικό αδένα είναι έως και πέντε φορές μεγαλύτερη από το γενικό πληθυσμό, αυξάνεται δε περισσότερο όταν υπάρχει ιστορικό καρκίνου του μαστού στο οικογενειακό της περιβάλλον. Εάν δε η ασθενής εμφανίσει λοβιακό καρκίνο του μαζικού αδένα, τότε ο κίνδυνος να αναπτύξει ίδιο τύπο καρκίνου και στον αντίθετο μαστό υπολογίζεται στο 25-50% (141,142).

Παρόλα αυτά, βιβλιογραφικά ακόμη δεν προτείνεται, στα πλαίσια ελέγχου της πορείας νόσου ασθενούς με καρκίνο του μαστού, η λήψη βιοψιών από τον έτερο υγιή μαστό μόνο κατόπιν κλινικών ενδείξεων και μαστογραφικών ευρημάτων τα οποία έχει αυτή παρουσιάσει. Οι μελέτες έχουν εξάλλου δείξει ότι η χημειοθεραπεία που λαμβάνουν οι πάσχοντες δρα αποτρεπτικά στην εμφάνιση νέας νεοπλασματικής εστίας στον έτερο υγιή μαστό (140).

## **2.6 Διάγνωση της νόσου**

### **2.6.1 Κλινική εξέταση**

Η κλινική εξέταση, ειδικά μέσω ψηλάφησης του μαζικού αδένα, αποτελεί μία διαχρονική και πολύτιμη μέθοδος στην αξιολόγηση και διάγνωση των νοσημάτων του μαστού συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Αποτελεί ακόμη μία εξαιρετικά χρήσιμη και πρακτική τεχνική, είτε αυτή εκτελείται από ειδικό ιατρό είτε από την ίδια την ασθενή (αυτοεξέταση). Μόνο το 60% των όγκων του μαστού, οι οποίοι ανιχνεύονται με μαστογραφία, είναι ψηλαφητοί. Μάλιστα μόλις το 10% των ψηλαφητών μαζών για τις οποίες υπάρχει υποψία κακοήθειας, αποδεικνύεται και μικροσκοπικά η παρουσία καοήθους νεοπλασίας. Επιπλέον, λάθη αναφέρονται κατά τη ψηλάφηση και αξιολόγηση λεμφαδένων, κυρίως μασχαλιαίων, αφού ύστερα από βιοψία και μικροσκοπική εξέταση μόνο το 15%, από τους λεμφαδένες με κλινική υπόνοια, παρουσιάζει κακοήθεια.

### **2.6.2 Μαστογραφία**

Η διάδοση της χρήσης της μαστογραφίας έχει ριζικά αλλάξει τη διαγνωστική προσέγγιση όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού. Εξαιρετικά μικροί όγκοι (1-2 mm) μπορούν να ανιχνευτούν μέσω της ανωτέρω τεχνικής, η οποία βασίζεται κυρίως στον ακτινολογικό εντοπισμό επασβεστώσεων. Η συχνότητα εμφάνισης επασβεστώσεων στον καρκίνο του μαστού είναι 50-60%, ενώ σε καλοήθεις βλάβες του μαζικού αδένου περίπου 20% (144,146). Υπάρχουν επίσης, ποσοτικές διαφορές στην ακτινολογική εικόνα των επασβεστώσεων. Τα μαστογραφικά ευρήματα στις ΗΠΑ πλέον ανακοινώνονται σε παγκόσμια κλίμακα και σχετική πληροφόρηση παρέχεται μέσω του Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS) (143).

Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι μια αρνητική μαστογραφία δεν εξαλείφει πλήρως τον κίνδυνο παρουσίας καρκινώματος του μαστού, αφού περίπου το 20% των ψηλαφητών όγκων δεν ανιχνεύονται μέσω αυτής της τεχνικής. Η συχνότητα ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος υπολογίζεται στο 1% περίπου.

Η συνεργασία ακτινολόγου, χειρουργού (ο οποίος θα πραγματοποιήσει τη βιοψία δια βελόνης) και του παθολογοανατόμου είναι απαραίτητη για να παραχθεί ένα ασφαλές για την ασθενή αποτέλεσμα. Μόνο το 20% των "ύποπτων" βλαβών μαστογραφικά είναι τελικά κακοήγη νεοπλασμάτα, από τα οποία η μεγάλη πλειοψηφία είναι ενδοπορικά (in situ) καρκινώματα του μαστού. Ο McDivitt έχει υπολογίσει ότι η πιθανότητα διάγνωσης καρκίνου του μαστού σε βιοψία, η οποία προέρχεται από μη ψηλαφητή μάζα αλλά έχει χαρακτηριστεί ύποπτη μαστογραφικά, είναι μόλις 2% (145).

Επιπλέον η υπερηχογραφική εξέταση του μαζικού αδένου παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία όσον αφορά στο γεγονός εάν μία μάζα είναι κυστική ή συμπαγούς σύστασης.

Το National Cancer Institute, στα πλαίσια οργανωμένου προγράμματος προληπτικού ελέγχου (screening test), συστήνει σε κάθε γυναίκα να πραγματοποιεί μαστογραφικό έλεγχο τουλάχιστον μία φορά ανά εξάμηνο μετά την ηλικία των 40 ετών. Τέλος η US Preventive Services Task Force, ορίζει ως ηλικιακό πλαίσιο τα 40 έως τα 75 έτη για τον εξαμηνιαίο έλεγχο των ασθενών (147).

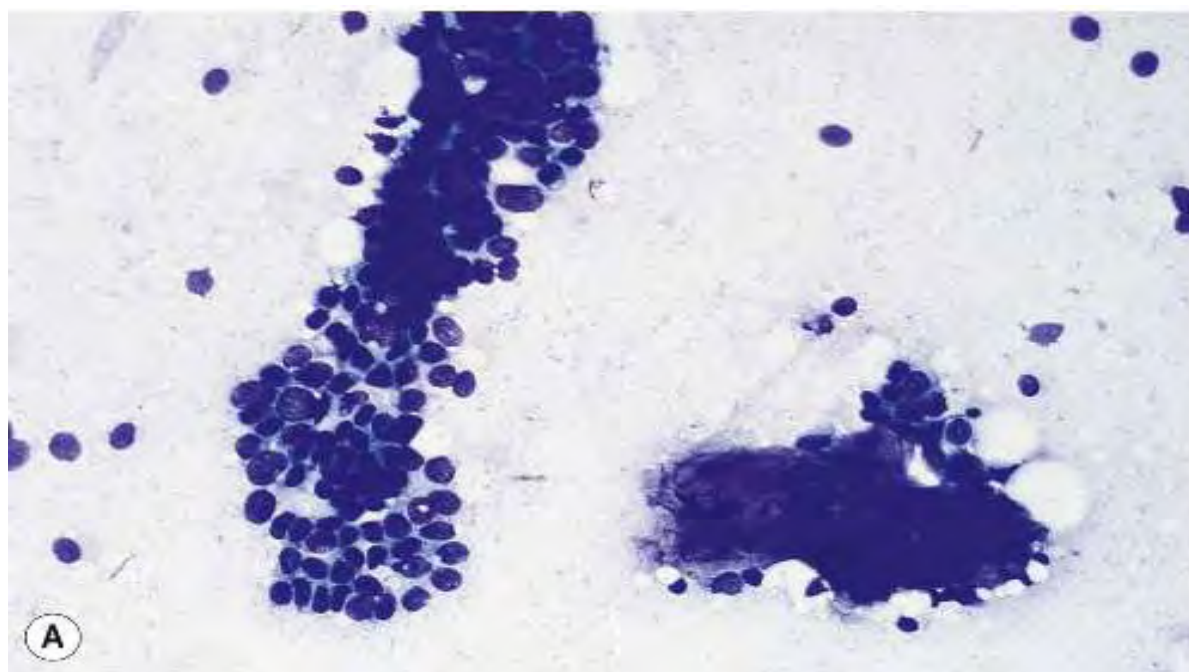
### **2.6.3 Κυτταρολογικές τεχνικές**

Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την απόκτηση κυτταρολογικού υλικού από βλάβες του μαζικού αδένου α) η αναρρόφηση κυτταρολογικού υλικού από το έκκριμα της θηλής και β) διαλεπτής βελόνης αναρρόφηση από την εστία της βλάβης.

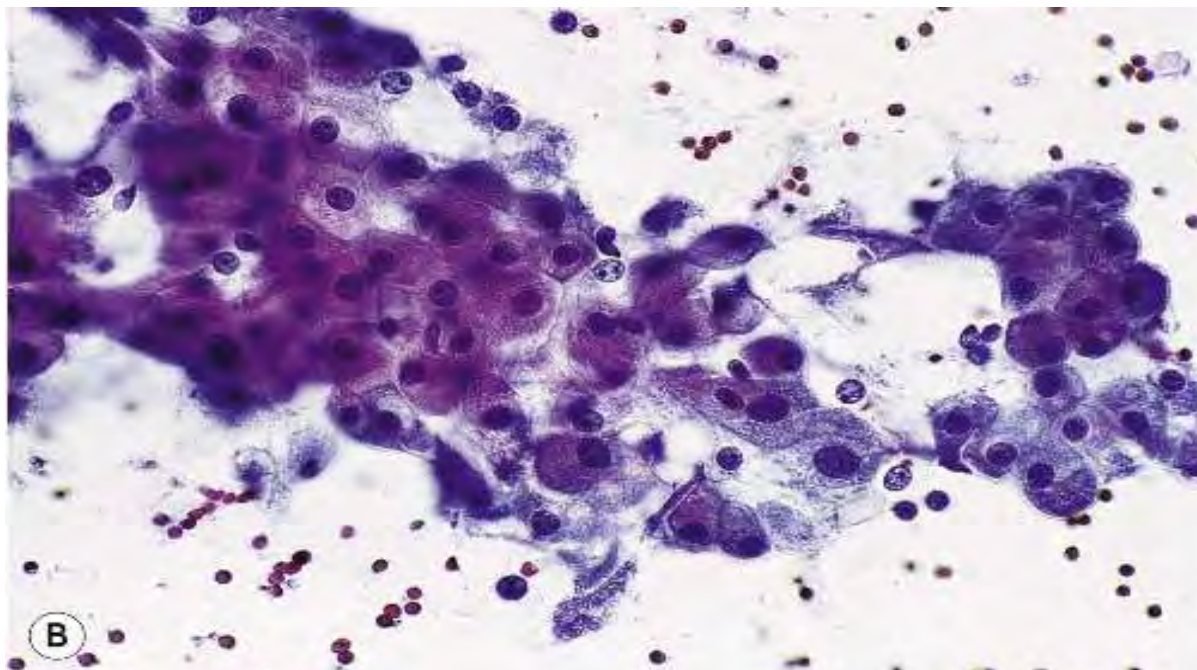
Η αναρρόφηση υλικού από το έκκριμα της θηλής είναι περιορισμένης αξίας είτε για τη διάγνωση κλινικά ή μαστογραφικά ανιχνεύσιμων βλαβών του μαζικού αδένα είτε για screeningtest. Ο αριθμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων είναι εξαιρετικά υψηλός σε τέτοιο βαθμό ώστε να την καταστήσει ως μία οριακής αξίας τεχνική.

Στην περίπτωση της FNA (fine needle aspiration - δια λεπτής βελόνης αναρρόφηση) η κατάσταση είναι εντελώς διαφορετική. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι περίπου 87%, η ειδικότητα πλησιάζει το 100%, η προγνωστική αξία (predictive value) για ένα θετικό αποτέλεσμα είναι περίπου 100%, ενώ για ένα αρνητικό αποτέλεσμα κυμαίνεται από 60-90% (148,152,154,153). Με βάσει τα ανωτέρω, οι περισσότερες καλοήθειες βλάβες του μαστού μπορούν να ερμηνευτούν κυτταρολογικά ως κακοήγη νεοπλάσματα πχ. ινοκυστική νόσος, επιθηλιακή υπερπλασία των πόρων του μαστού (150). Η ικανότητα του ιατρού στη λήψη του υλικού καθώς και το μέγεθος της βλάβης συμβάλλουν στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων διαγνωστικά. (149). Το υλικό από την FNA είναι κατάλληλο για προσδιορισμό υποδοχέων οιστρογόνων καθώς και για τον έλεγχο έκφρασης ογκοπρωτεϊνών.

Καμία όμως κυτταρολογική τεχνική δεν υποκαθιστά σε αξιοπιστία την ιστοπαθολογική εξέταση ιστοτεμαχίων από έμπειρο παθολογοανατόμο, καθώς και ότι κανένα αρνητικό αποτέλεσμα κυτταρολογικής εξέτασης δεν πρέπει να θεωρείται σαν απόλυτο αποτέλεσμα εάν πάντα υπάρχει κλινικά η υποψία κακοήθειας του μαζικού αδένα (151)(Εικόνα 5-6).



Εικόνα 5:Κυτταρολογική εξέταση από FNA μαζικού αδένα (Rosai and Ackerman 10th Edition - κεφάλαιο: 20 - Breast σελίδα 1688)



Εικόνα 6: Κυτταρολογική εξέταση από FNA μαζικού αδένου (Rosai and Ackerman 10th Edition - κεφάλαιο: 20 - Breast σελίδα 1688)

#### **2.6.4 Βιοψία Βελόνης - Needle core biopsy**

Η βιοψία βελόνης για τη λήψη ιστοτεμαχίων για παθολογοανατομική εξέταση, τα τελευταία χρόνια, προτιμάται περισσότερο ως διαγνωστική τεχνική σε σχέση με την FNA, επειδή επιτρέπει την κυτταρολογική και αρχιτεκτονική αξιολόγηση του ιστού, την ευκολότερη ταυτοποίηση των επασβεστώσεων και την καλύτερη διάγνωση των καλοήθων βλαβών του μαστού από τον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, μειώνει τον αριθμό των ανεπαρκών δειγμάτων και απαιτεί μικρότερη διαγνωστική εμπειρία από τον ειδικό που αναλαμβάνει την εξέταση. Οι διαγνώσεις που βασίζονται σε needle core biopsies είναι ακριβείς σε ποσοστό περίπου 90%.

Επιπλοκές της τεχνικής είναι αιμορραγία, αντιδραστικοί όζοι από ατρακτόμορφα κύτταρα, και σχηματισμός επιδερμοειδών κύστεων (155,156). Τέλος, εξαιρετικά πιθανό (συχνότερο σε σύγκριση με την FNA) είναι η μηχανική μεταφορά κάποιων εκ των κυτταρικών στοιχείων του όγκου στο στρώμα ή ακόμα και στον αυλό αγγείων. Το γεγονός αυτό είναι σύνηθες τόσο σε καλοήθεις όσο και σε κακοήθεις θηλωματώδεις βλάβες του μαζικού αδένου, πιθανότερα λόγω της μεγάλης εύθρυπτης σύστασης τους (το εύρημα αυτό έχει αμφίβολη κλινική σημασία) (157).

## **2.7 Μικροσκοπική ταξινόμηση καρκίνων του μαστού**

Η παρακάτω ταξινόμηση, όπως επίσημα είναι δημοσιευμένη στη WHO-BREAST, βασίζεται στην αρχιτεκτονική και τη μορφή των νεοπλασματικών κυτταρικών στοιχείων που συνιστούν κάθε όγκο-καρκίνωμα του μαστικού αδένα. Στην κατά WHO ιστολογική ταξινόμηση στηρίζεται και το διαγνωστικό έργο κάθε παθολογοανατόμου. Κάθε διαφορετικός υπότυπος καρκινώματος είτε των λοβίων είτε των κυττάρων που συνιστούν τους πόρους του μαστού έχει συχνά διαφορετική πρόγνωση ακόμη και κίνδυνο εμφάνισης μεταστατικών εστιών και απαιτεί διαφορετική - ειδική ανά περίπτωση - αντιμετώπιση. (παραδείγματα υποτύπων καρκίνου του μαστού - εικόνες 7-8-9 )

### **A) In situ καρκινώματα του μαστού:**

- 1) ενδοπορικό καρκίνωμα (in situ) του μαστού και οι υπότυποι του πχ ηθμοειδές, συμπαγές, comedo, κτλ.
- 2) ενδολοβιακό καρκίνωμα (in situ) του μαστού.

### **B) Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού:**

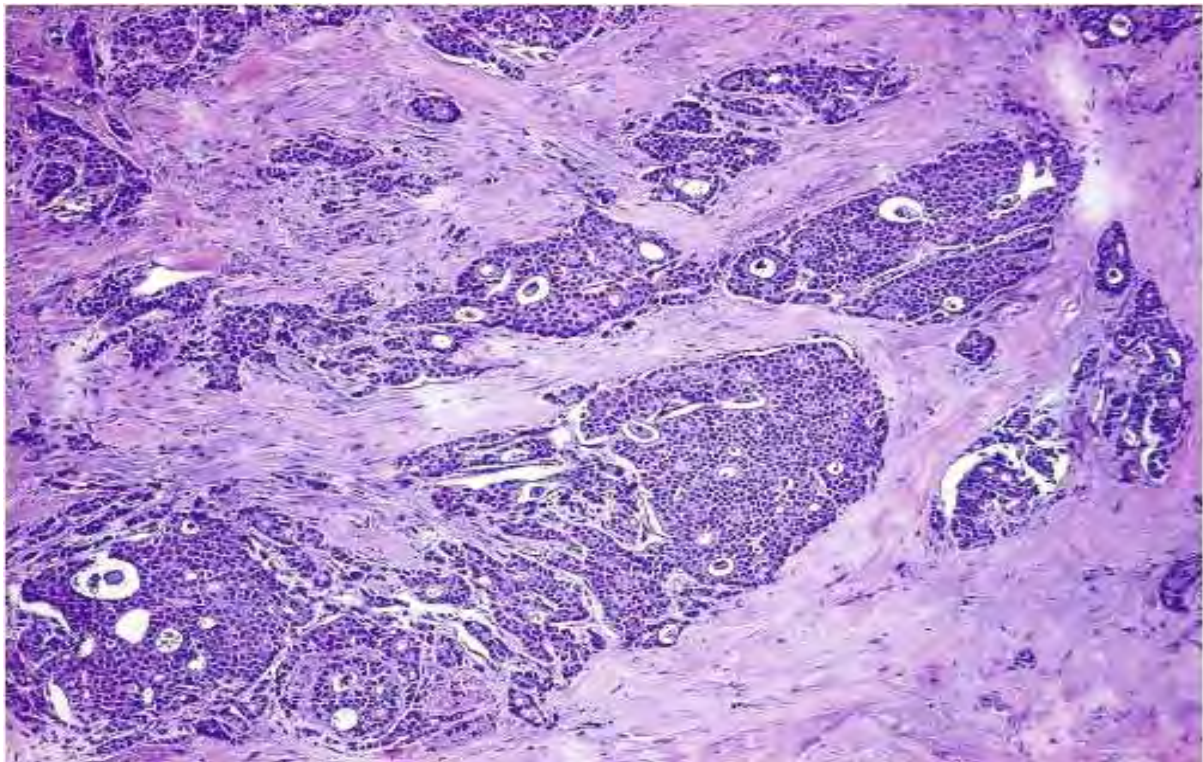
- 1) κλασσικό NST (non specific type) διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού μη ειδικού τύπου.
- 2) σωληνώδες καρκίνωμα των πόρων του μαστού.
- 3) ηθμοειδούς τύπου διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού.
- 4) βλεννώδες καρκίνωμα των πόρων του μαστού.
- 5) μυελλοειδές (medullary) καρκίνωμα των πόρων του μαστού.
- 6) διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα των πόρων του μαστού.
- 7) διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα των πόρων του μαστού.
- 8) αποκρινές καρκίνωμα των πόρων του μαστού.
- 9) εκκριτικού τύπου (secretory) διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού.
- 10) καρκινώματα με ενδοκρινείς χαρακτήρες: Στην κατηγορία αυτή των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού διακρίνουμε τους εξής υποτύπους: καρκινοειδές, μικροκυτταρικό, ο από μεγάλα κύτταρα και ο συμπαγής υπότυπος.



11) Μεταπλαστικό καρκίνωμα του μαστού: αδеноπλακώδες, ατρακτοκυτταρικό, πλακώδες, πλακώδες-ακανθολυτικό (acantholytic)

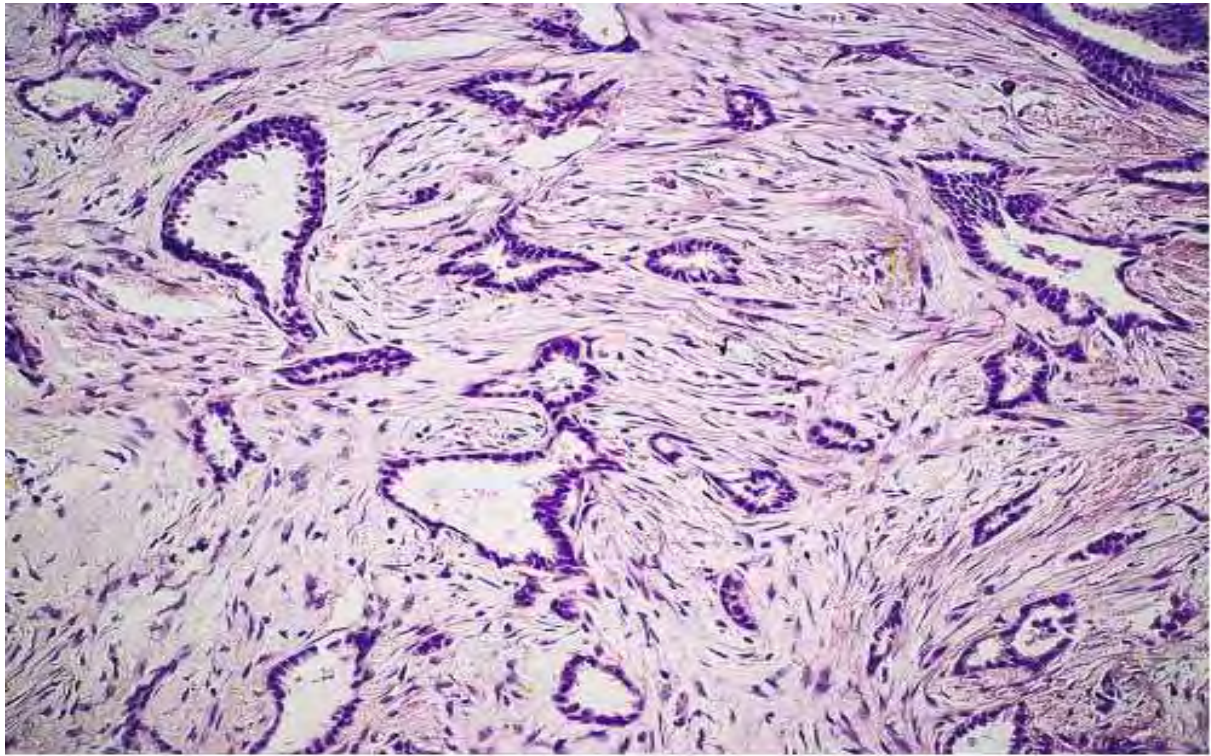
Γ) Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα του μαστού:(παραθέτουμε τους υπότυπους του)

- 1) κλασσικό διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα.
- 2) συμπαγές καρκίνωμα.
- 3) δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring cell carcinoma).
- 4) κυψελικού (alveolar) τύπου διηθητικό καρκίνωμα.
- 5) πλειόμορφο καρκίνωμα.
- 6) βασικοειδές (basal-like) λοβιακό καρκίνωμα.

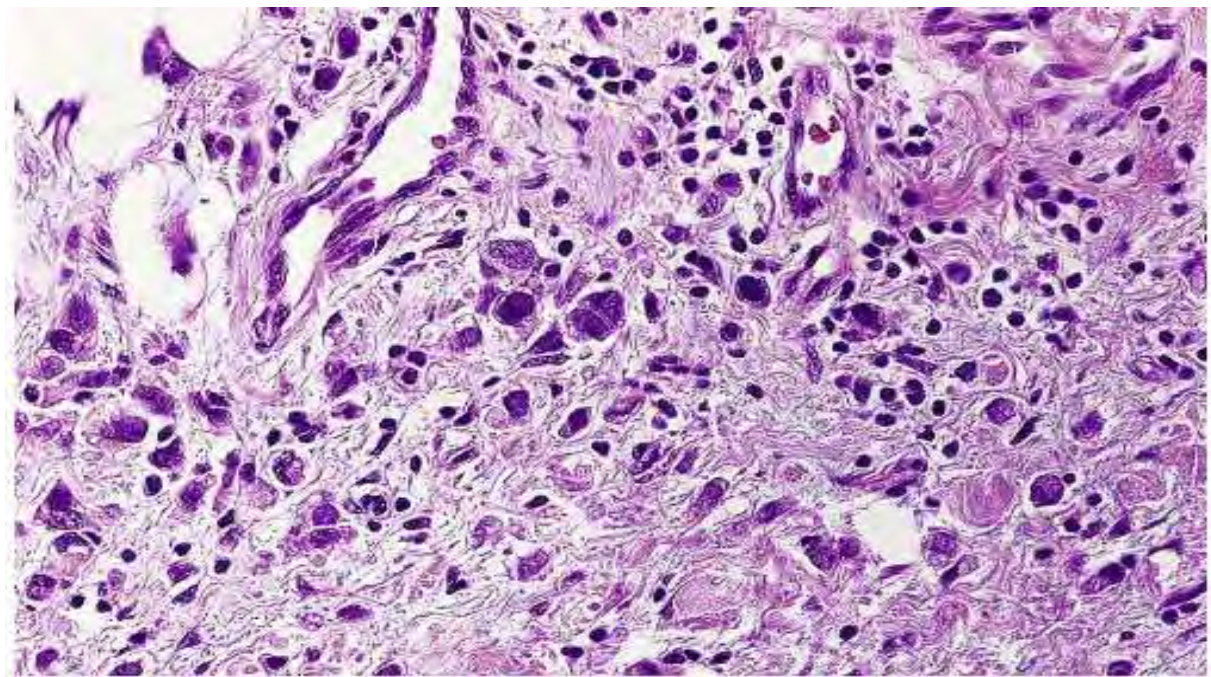


Εικόνα 7 : Μυελλοειδές καρκίνωμα του μαστικού αδένα (Rosai and Ackerman 10th Edition - κεφάλαιο: 20 Breast -σελίδα 1699)





Εικόνα 8: Σωληνώδες καρκίνωμα του μαζικού αδένου (Rosai and Ackerman 10th Edition - κεφάλαιο: 20 Breast -σελίδα 1698)



Εικόνα 9: Λοβιακό καρκίνωμα του μαζικού αδένου (πλειόμορφο) (Rosai and Ackerman 10th Edition - κεφάλαιο: 20 Breast - σελίδα 1702)



## **2.8 - Μεταλλάξεις και επιγενετική στον καρκίνο του μαστού**

### **2.8.1 - Γενετικές μεταλλάξεις και καρκίνος του μαστού**

#### **2.8.1.1 - BRCA1**

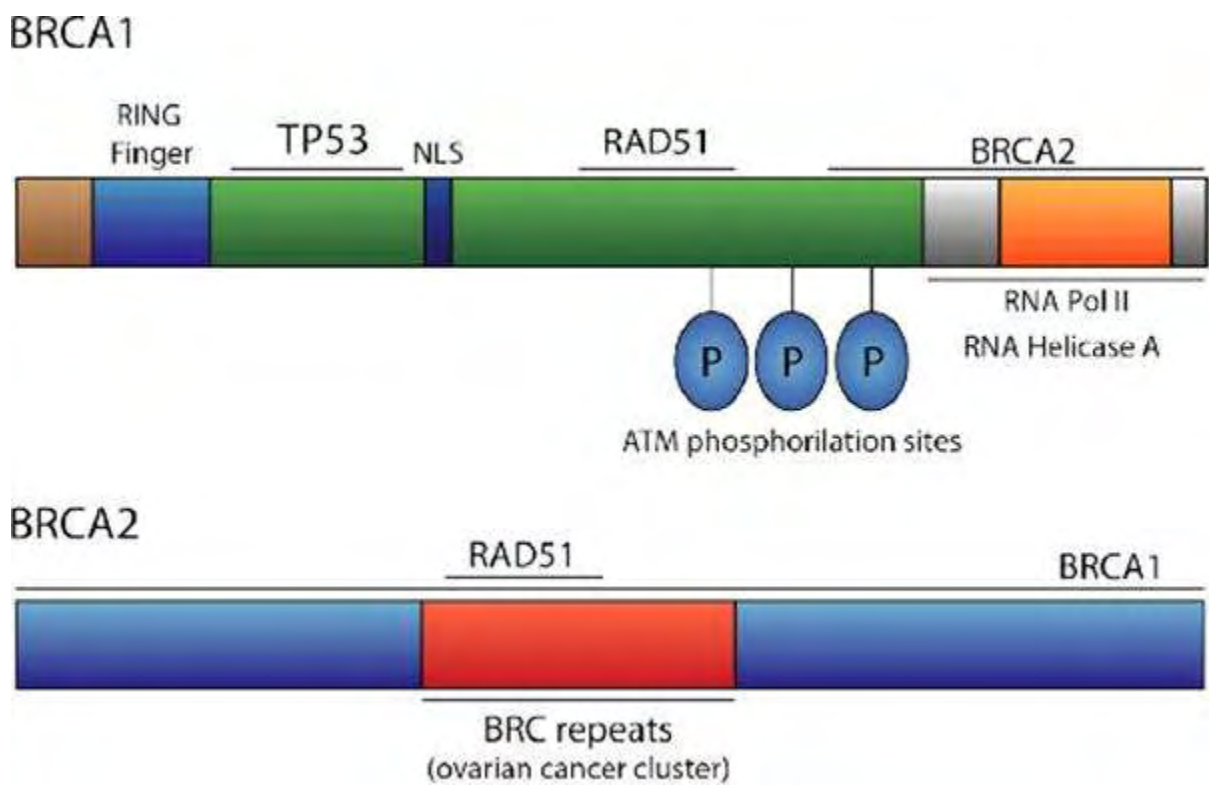
Το γονίδιο BRCA1 αποτελείται από 22 εξόνια και κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη μήκους 220kDa (1863 συνολικά αμινοξέων) (9). Το γονίδιο BRCA1 φέρει μία zinc δεσμευτική RING περιοχή στη θέση του αμινο-τελικού άκρου της, καθώς και ένα οξινό - καρβοξυλικό τελικό άκρο, το οποίο και διατηρείται μεταξύ των διαφόρων ειδών και κατά την εξελικτική διαδικασία. Το γονίδιο BRCA1 εκφράζεται σε διαφορετικούς ιστούς, όπως π.χ. ο μαστικός αδένας και οι ωοθήκες. Αρχικά, οι μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν στο γονίδιο BRCA1 περιελάμβαναν μία 11 μήκους βάσεων διαγραφή, μία εισαγωγή ενός ζεύγους βάσεων, ένα κωδικόνιο τερματισμού, μία missense αντικατάσταση και μία inferred ρυθμιστική μετάλλαξη (6). Κατόπιν, η διεξαγωγή ερευνών, στις οποίες συμμετείχαν 372 ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών (χωρίς οποιαδήποτε συγγενική σχέση μεταξύ τους) προερχόμενοι από οικογένειες υψηλού κινδύνου, έδειξαν ότι 80 ασθενείς είχαν μία μετάλλαξη στο BRCA1 γονίδιο τους (21,5% της κοόρτης). Τριάντα οκτώ κοινές μεταλλάξεις αναγνωρίστηκαν μεταξύ 63 μεταλλάξεων που ταυτοποιήθηκαν σε μία πλήρη σάρωση του γονιδίου BRCA1(10). Μέχρι και σήμερα, περισσότερες από 1600 μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο BRCA1, και η πλειοψηφία αυτών των μεταλλάξεων είναι υπεύθυνες για αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης κατά την έκφραση του γονιδίου (missense μεταλλάξεις) ή για παραγωγή μιας μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Επίσης, σε άτομα, τα οποία έφεραν μετάλλαξη/εις στο γονίδιο BRCA1 σε γαμετικά κύτταρα, παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν μεταλλάξεις στο wild-type αλληλόμορφο σε σωματικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το BRCA1 ανήκει στα ογκο-κατασταλτικά γονίδια (11). Μάλιστα, οι γυναίκες με BRCA1 μεταλλάξεις εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο των ωοθηκών, ενώ αντίστοιχα οι άνδρες, που φέρουν παθολογικές μεταλλάξεις, κινδυνεύουν (σε μικρότερο βαθμό) να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη (12) (Εικόνα 10).

#### **2.8.1.2 BRCA2**

Το BRCA2 γονίδιο είναι μεγαλύτερο από το BRCA1, έχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης μήκους 10,3kb και από την έκφραση του γονιδίου κωδικοποιείται μία πυρηνική πρωτεΐνη 384kDa. Το BRCA2 δεν παρουσιάζει υψηλού βαθμού ομολογία, όσον αφορά την αλληλουχία των βάσεων του, με άλλα γνωστά γονίδια (8). Ωστόσο, οι πρωτεΐνες που παράγονται από την έκφραση των γονιδίων BRCA1/2 φαίνεται ότι μοιράζονται λειτουργικές

ομοιότητες, οι οποίες δικαιολογούν γιατί οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια ευθύνονται για μία κληρονομικού τύπου, ειδική προδιάθεση για την ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών ή του μαστικού αδένος (11).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το BRCA2 έχει συνδεθεί με 6 διαφορετικές μεταλλάξεις, σε γαμετικά κύτταρα, (σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου του μαστού), με αποτέλεσμα να προκαλείται διακοπή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της μεταγραφείσας μονάδας 17. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με διακοπή της μετάφρασης-πρωτεϊνοσύνθεσης (πχ διαγραφές ή/και μεταβολές του πλαισίου ανάγνωσης που ευθύνονται για την εμφάνιση πρόωρα κωδικονίων λήξης). Περισσότερες από 1800 μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί, μέχρι στιγμής, στο γονίδιο BRCA2 και περιλαμβάνουν διαγραφές, εισαγωγή βάσης/ων (insertions), ή nonsense μεταλλάξεις με αποτέλεσμα την παραγωγή μίας πρωτεΐνης μειωμένου μήκους. Επακόλουθο των ανωτέρω είναι και η απώλεια της λειτουργικότητας της παραγόμενης πρωτεΐνης (11). Οι φορείς των μεταλλάξεων στο γονίδιο BRCA2 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο των χοληφόρων, της χοληδόχου κύστης, του στομάχου καθώς και μελάνωμα (14)(Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Απεικόνιση των γονιδίων BRCA1/2 – (Integr Cancer Sei Ther: 2017 February;4).

Στον (Πίνακα 1) που ακολουθεί παρουσιάζονται όλες οι BRCA σχετιζόμενες πρωτεΐνες και οι λειτουργίες αυτών.

<b>Protein</b>	<b>Function of interacting protein</b>
<b>RAD51</b>	<b>Double strand break repair</b>
<b>RAD50</b>	<b>Double strand break repair</b>
<b>BASC complex</b>	<b>Mismatch repair</b>
<b>H2AX</b>	<b>Signaling of DNA damage</b>
<b>TP53</b>	<b>Tumor suppressor gene – Transcription factor</b>
<b>pRB</b>	<b>Tumor suppressor gene – Cell cycle regulator</b>
<b>c-myc</b>	<b>Oncogene – Transcription factor</b>
<b>STAT1</b>	<b>Signal Transducer – Transcription factor</b>
<b>E2F</b>	<b>Cell cycle regulator – Transcription factor</b>
<b>RNA Pol II</b>	<b>Transcription</b>
<b>Estrogen Receptor</b>	<b>Ligand responsive transcription factor</b>
<b>Androgen Receptor</b>	<b>Ligand responsive transcription factor</b>
<b>SWI/SNF</b>	<b>Chromatin remodeling complex</b>
<b>HDAC</b>	<b>Histone deacetylation – chromatin remodeling</b>
<b>BRAP2</b>	<b>Cytoplasmic retention</b>
<b>PALB2</b>	<b>Double-strand break repair</b>
<b>BARD1</b>	<b>Ubiquitin ligase</b>

Πίνακας 1: (Integr Cancer Sei Ther: 2017).

### **2.8.1.3 Γονίδια που πιθανώς σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού**

Εκτός από τα BRCA1/2 γονίδια, έχουν αναγνωριστεί αλληλόμορφα που σχετίζονται με μεταλλάξεις οι οποίες προδιαθέτουν για εμφάνιση καρκίνου του μαστού και παρουσιάζουν διαφορετικού επιπέδου διεισδυτικότητα. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για ένα μικρό ποσοστό του κληρονομικής αιτιολογίας καρκίνου του μαστού. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο STK11 (η έκφραση του έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας σερίνης-θρεονίνης κινάσης της STK11/LKB1) μπορούν εν δυνάμει να προκαλέσουν την εμφάνιση του συνδρόμου Peutz-Jegher, ενώ έχουν συνδεθεί με ένα σχετικό κίνδυνο εμφάνισης, υπολογίζεται στο 20,3 περίπου, καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με άτομα που δεν φέρουν μεταλλάξεις του ανωτέρω γονιδίου (28). Μία άλλη μετάλλαξη υψηλής διεισδυτικότητας συμβαίνει στο ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης (phosphatase and tensin homolog – PTEN) και η οποία έχει συνδεθεί με το σύνδρομο Cowden. Η ανωτέρω μετάλλαξη

έχει συσχετιστεί με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού που υπολογίζεται από 20 έως και 30% περίπου (15). Επιπλέον οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53, οι οποίες εμφανίζονται σε γαμετικά κύτταρα, έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση του συνδρόμου Li-Fraumeni, ενώ η διεισδυτικότητα των μεταλλάξεων όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού προσεγγίζει το 100% ειδικά όταν οι φορείς των ανωτέρω μεταλλάξεων επιβιώσουν και μετά το πέρας της παιδικής ηλικίας (16).

Σε πρόσφατες μελέτες, γονίδια μετρίου βαθμού διεισδυτικότητας έχουν συνδεθεί με το κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού, τα οποία μάλιστα συχνά συμμετέχουν στη λειτουργία των γονιδίων BRCA. Οι φορείς των μεταλλάξεων στο γονίδιο ATM (αταξία-τηλεαγγειεκτασία) εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού συγκριτικά με τους μη φορείς (17). Όσον αφορά τη CHEK2, μία κινάση ελέγχου του κυτταρικού κύκλου η οποία είναι απαραίτητη στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA (στο οποίο συμμετέχουν και το TP53 και τα BRCA), έχουν αναφερθεί παθολογικά αλληλόμορφα του γονιδίου αυτού, οι φορείς των οποίων παρουσιάζουν έως και δύο φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού από το γενικό πληθυσμό (18). Επιπλέον, το γονίδιο PALB2 έχει συνδεθεί με την παραγωγή μίας λειτουργικής πρωτεΐνης η οποία αλληλεπιδρά με τη BRCA2 κατά την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού. Η τύπου N αναιμία Fanconi είναι νόσος η οποία εμφανίζεται σε άτομα αφού κληρονομήσουν δύο παθολογικά αλληλόμορφα γονίδια PALB2 και χαρακτηρίζεται από τη εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και αιμοπεταλίων. Πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι οι γυναίκες με παθολογικά επίπεδα PALB2 εμφανίζουν 14% περίπου μεγαλύτερο κίνδυνο μέχρι και την ηλικία των 50 ετών και 35% μεγαλύτερο κίνδυνο μέχρι την ηλικία των 70 ετών για την ανάπτυξη καρκίνου συγκριτικά με τα υγιή άτομα (19). Επίσης παθολογικές μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί και στο γονίδιο RAD51 (20).

Σε άλλη μελέτη, οι μελετητές εστίασαν την έρευνα τους σε ένα πάνελ 25 γονιδίων σε δείγμα 35.000 γυναικών με καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν την παρουσία παθολογικών αλληλομόρφων στο 9,3% του πληθυσμού που εξετάστηκε. Από τα αλληλόμορφα αυτά, 51,5% αφορούσαν τα BRCA γονίδια, 9,7% το ATM γονίδιο, 11,7% το γονίδιο CHECK2 και το 9,3 % το PALB2. Ο επιπολασμός των παθολογικών αλληλομόρφων, όσον αφορά στα γονίδια BARD1 και RAD51, ήταν στατιστικά υψηλότερος μεταξύ των ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (21). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα γονίδια BRCA1, BRCA2, PTEN, ATM, CHECK2, PALB2, RECQL, NBN καθώς και ένας σημαντικός αριθμός μειωμένης διεισδυτικότητας αλληλομόρφων ευθύνονται συνολικά για το

50% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού (22). Το εύρημα αυτό δείχνει ότι ο καρκίνος του μαστού αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα και ότι μένουν να ταυτοποιηθούν επιπλέον παθολογικά αλληλόμορφα υπεύθυνα για τη νόσο.

#### **2.8.1.4 Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) και καρκίνος του μαστού**

Στη σύγχρονη ερευνητική μεθοδολογία η χρήση της αλληλούχισης του συνόλου των εξωνίων στο γονιδίωμα παρέχει στους ερευνητές τη δυνατότητα ταυτοποίησης μοναδικών κληρονομούμενων μεταλλάξεων (17). Σε μία έρευνα μελετήθηκαν 4398 περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο του μαστού σε αντιπαραβολή με 4316 περιπτώσεις υγιών ατόμων (control group), ενώ σε δεύτερο χρόνο εξετάστηκαν 30 SNPs. Μελετήθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί κοινών αλληλομόρφων στα γονίδια FGFR2 (rs2981582), TNRC9 (rs3803662) και MAR3K1 (rs889312) και κατόπιν συσχετίστηκαν με τον κίνδυνο (αυξημένο) εμφάνισης καρκίνου του μαστού στο γενικό πληθυσμό (24). Περαιτέρω γενετικός έλεγχος έδειξε ότι οι SNPs (rs2981582) και (rs889312) των γονιδίων FGFR2 και MAR3K1, αντίστοιχα συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο BRCA2 και όχι στο BRCA1. Ο SNP (rs3803662) στο γονίδιο TNRC9 συνδέθηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε φορείς μεταλλάξεων και στα δύο γονίδια BRCA1/2 (25). Σε μελέτη του 2009 ένα περικεντρομερικό SNP στο χρωμόσωμα 1p11.2 ταυτοποιήθηκε σε γενετική θέση που γειτνιάζε με τα γονίδια NOTCH2 και FCGR1B (26). Τέλος σε μία ευρείας κλίμακας μελέτη 29807 νέα SNPs ταυτοποιήθηκαν, εκ των οποίων 41 νέοι γενετικοί τόποι συνδέθηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (27).

## **2.8.2 Επigenετική καρκίνου του μαστού**

### **2.8.2.1 Εισαγωγικά**

Η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα miRNAs αποτελούν τις κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις, οι οποίες και σχετίζονται άμεσα με την έκφραση των γονιδίων και κατά αυτόν τον τρόπο με την καρκινογένεση. Αυτοί οι μηχανισμοί αποτελούν αντιστοίχως σημαντικούς παράγοντες για την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

### **2.8.2.2 Η μεθυλίωση του DNA**

Μεταξύ των επιγενετικών τροποποιήσεων, η πλέον μελετημένη είναι η μεθυλίωση του DNA και συγκεκριμένα των CpG νησιδίων του DNA (60). Με τον όρο δε, μεθυλίωση αναφερόμαστε στην προσθήκη μίας μεθυλο-ομάδας (-CH<sub>3</sub>) στον 5-άνθρακα της κυτοσίνης ενός CpG δινουκλεοτιδίου (61). Κάθε CpG δινουκλεοτίδιο αποτελείται από μία κυτοσίνη, η οποία και προηγείται μίας γουανίνης, ενώ οι CpG νησίδες είναι αλληλουχίες μήκους από 500 έως και 2000 ζευγών βάσεων κυρίως εντοπιζόμενες πλησίον της περιοχής όπου και βρίσκεται ο προωθητής κάθε γονιδίου (55). Οι αλληλουχίες αυτές υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι μεθυλιωμένες, γεγονός που επιτρέπει τη μεταγραφή και γενικότερα έκφραση των γονιδίων. Ωστόσο, μελέτες σε καρκινικά κύτταρα έχουν δείξει ότι παρατηρείται έντονη υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων, γεγονός που ευθύνεται για σημαντικού βαθμού αποσιώπηση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων (63). Ειδικά για τα καρκινικά κύτταρα στο μαστικό αδένα, τα γονίδια των οποίων η έκφραση έχει αποσιωποηθεί είναι βάσει μελετών κυρίως προαποπτωτικά γονίδια (π.χ. HOXA5, TMS1), γονίδια-παρεμποδιστές του κυτταρικού κύκλου (p16, RASSF1A) ή γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA (BRCA1) (64,65,53).

Η μεθυλίωση των CpG νησιδίων του DNA λαμβάνει χώρα με τη δράση ενζύμων γνωστών ως μεθυλο-τρανσφεράσες (DNMTs). Δύο τύποι DNMTs έχουν περιγραφεί: οι “de novo” DNMTs (DNMT3A και DNMT3B), οι οποίες σχετίζονται με τη μεθυλίωση που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της εμβρυολογικής ανάπτυξης, και οι “maintenance” DNMTs (DNMT1), οι οποίες και παρουσιάζουν υψηλού βαθμού έκφραση κατά τη διάρκεια

της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου και είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση του μοντέλου μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια της ενηλίκου ζωής και ανάπτυξης (66).

Διαφορετικοί τύποι παρεκκλίσεων, όσον αφορά τη μεθυλίωση του DNA, μπορούν να συμβούν στον καρκίνο (67), όπως για παράδειγμα η υπερμεθυλίωση γενετικών τόπων που οδηγεί στην αποσιώπηση έκφρασης όγκο-κατασταλτικών γονιδίων (54,63,68-70), ή η υπομεθυλίωση μοναδικών γονιδίων (unique genes) και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (71). Στον ανθρώπινο πληθυσμό παγκοσμίως η υπομεθυλίωση αυξάνεται παράλληλα με την ηλικία και συνδέεται με τη γενομική αστάθεια και την αυξημένη έκφραση ογκογονιδίων (72-74).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι η μεθυλίωση του APC, CDH1, CTNNB1 και του 14-3-3 γονιδίου Sigma (πρόκειται για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση), έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (75,76). Επιπλέον, στην έρευνα των Park και συν., η μελέτη του επιπέδου μεθυλίωσης σε 179 δείγματα ασθενών με διηθητικού τύπου καρκίνο του μαστού έδειξε ότι η υπομεθυλίωση δύο γενετικών τόπων που αφορούσαν προωθητές των Alu και LINE-1 μπορεί να συσχετιστεί ισχυρά με τον HER-enriched υπότυπο του καρκίνου του μαστού (77). Ένα ακόμη παράδειγμα αφορά το γονίδιο BRCA1: όταν είναι υπερμεθυλιωμένο το αποτέλεσμα της γονιδιακής έκφρασης είναι το ίδιο με εκείνο που παρατηρείται σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού με μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA1 (78). Τα ανωτέρω δείχνουν ότι αλλαγές-μεταβολές στη μεθυλίωση των γονιδίων σχετίζονται με την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

### **2.8.2.3 Μέτα-μεταφραστική τροποποίηση των ιστονών**

Η μεθυλίωση του DNA είναι στενά συνδεδεμένη με την μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ιστονών γεγονός που σχετίζεται με τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης (79). Οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες που συμβάλλουν στο πακετάρισμα του DNA. Όταν γύρω από ένα οκταμερές αποτελούμενα από τέσσερα διαφορετικά είδη ιστονών (H2A, H2B, H3, H4) περιελλίσεται τμήμα DNA μήκους 147 ζευγών βάσεων τότε σχηματίζεται το λεγόμενο νουκλεόσωμα (80). Αρκετές μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών μπορεί να παρατηρηθούν όπως για παράδειγμα, η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η ουβικουιτίνωση, η φωσφορυλίωση, η σουμολύωση (sumoylation) ή η πολυ-ADP-ριβοσυλίωση (poly-ADP-ribosylation) (81). Έχει παρατηρηθεί ότι η ακετυλίωση ενός υπολείμματος λυσίνης στο N-τελικό άκρο των ιστονών οδηγεί σε μόρια χρωματίνης με δομή ανοικτού τύπου (open structure), ενώ αντιθέτως η αποακετυλίωση οδηγεί σε περισσότερο κλειστού τύπου μόρια χρωματίνης. Το ανωτέρω φαινόμενο ελέγχεται από ένζυμα γνωστά ως ακετυλοτρανσφεράσες

των ιστονών (HAT) και αποακετυλοτρανσφεράση των ιστονών (HDAC) (53). Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι η μεθυλίωση του DNA που σχετίζεται με την αποακετυλίωση των ιστονών οδηγεί στην αποσιώπηση έκφρασης των γονιδίων ενώ η απομεθυλίωση του DNA που σχετίζεται με την ακετυλίωση των ιστονών οδηγεί στην γονιδιακή έκφραση και μετάφραση (82-85).

Επιπροσθέτως, μία ακόμη τροποποίηση των ιστονών, η οποία οδηγεί σε δομή χρωματίνης ανοικτού τύπου είναι η μεθυλίωση της λυσίνης 4 (K4) της ιστόνης 3 (H3), ενώ η μεθυλίωση στην H3 της λυσίνης 9 (K9) ή της K27 ή η μεθυλίωση στην H3 της K20 σχετίζεται με παρεμπόδιση της μεταγραφής και επομένως της γονιδιακής έκφρασης (62). Όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού, προσφάτως έχουν αναφερθεί ξεχωριστά πρότυπα μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών (53). Για παράδειγμα, στον ER αρνητικό τύπο καρκίνο του μαστού, οι DNMTs και HDAC παρουσιάζουν υψηλού βαθμού έκφραση στην περιοχή του υποκινητή του ER γονιδίου, το οποίο ευθύνεται για την απενεργοποίηση του γονιδίου (86).

Για να καταστεί δυνατή εξάλλου η διασπορά νεοπλασματικών, επιθηλιακού τύπου, καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένους ιστούς (σχηματισμός μεταστατικών εστιών) θα πρέπει τα καρκινικά κύτταρα της πρωτοπαθούς εστίας να αποκτήσουν το λεγόμενο μεσεγχυματικό φαινότυπο διαμέσου της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) (56,58). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ιστονική τροποποίηση φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην έναρξη της EMT διαδικασίας, ώστε τα καρκινικά κύτταρα να αποκτήσουν μεταστατικό δυναμικό (58,59). Για παράδειγμα, στον basal-υπότυπο του καρκίνου του μαστού και στο BRCA1-deficient τύπο καρκίνου του μαστού, η έναρξη της EMT είναι μερικώς σχετιζόμενη με την μείωση της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την E-cadherin (57,58).

#### **2.8.2.4 Επιγενετικές αλλαγές και μικρο-περιβάλλον του όγκου στον καρκίνο του μαστού**

Όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού, θεωρείται ότι η εξέλιξη του σχετίζεται άμεσα από τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ειδικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών (επιθηλιακών) κυττάρων και των ινοβλαστών που σχετίζονται με τον καρκίνο (88). Το στρωματικό στοιχείο που σχετίζεται με τον όγκο, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, μπορεί να συνθέσει ποικίλους αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, οι οποίοι ευνοούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξάνουν το μεταστατικό δυναμικό στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (89). Επιπλέον, η EMT διαδικασία (σημαντική για την εξέλιξη του όγκου και την εμφάνιση μεταστατικών εστιών) εξαρτάται από διάφορα σήματα τα οποία λαμβάνει από το παρακείμενο κυτταρικό περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένου του TGF-β, ο οποίος διεγείρει



την έκφραση των EMT- TFs, όπως το Snail, Twist και το ZEB1, γεγονός που οδηγεί στην αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου της E-cadherin (58,59).

Επιπροσθέτως, το μικροπεριβάλλον του καρκίνου του μαστού είναι πιθανό να αποτελέσει ένα νέο εργαλείο με σκοπό τη διάγνωση και τη θεραπεία στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (87,90). Για παράδειγμα, οι ινοβλάστες εκφράζουν ειδικούς δείκτες όπως η άλφα-ακτίνη των λείων μυϊκών ινών ( $\alpha$ -SMA) ή ο τύπος I κολλαγόνου, οι οποίοι ως δείκτες μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση του καρκίνου (89,91). Τέλος, το επιγένομα των άνοσο-T κυττάρων που περιβάλλουν τους όγκους μπορούν επίσης να συμβάλλουν στον καθορισμό της πρόγνωσης της νόσου και στην πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος (92,93).

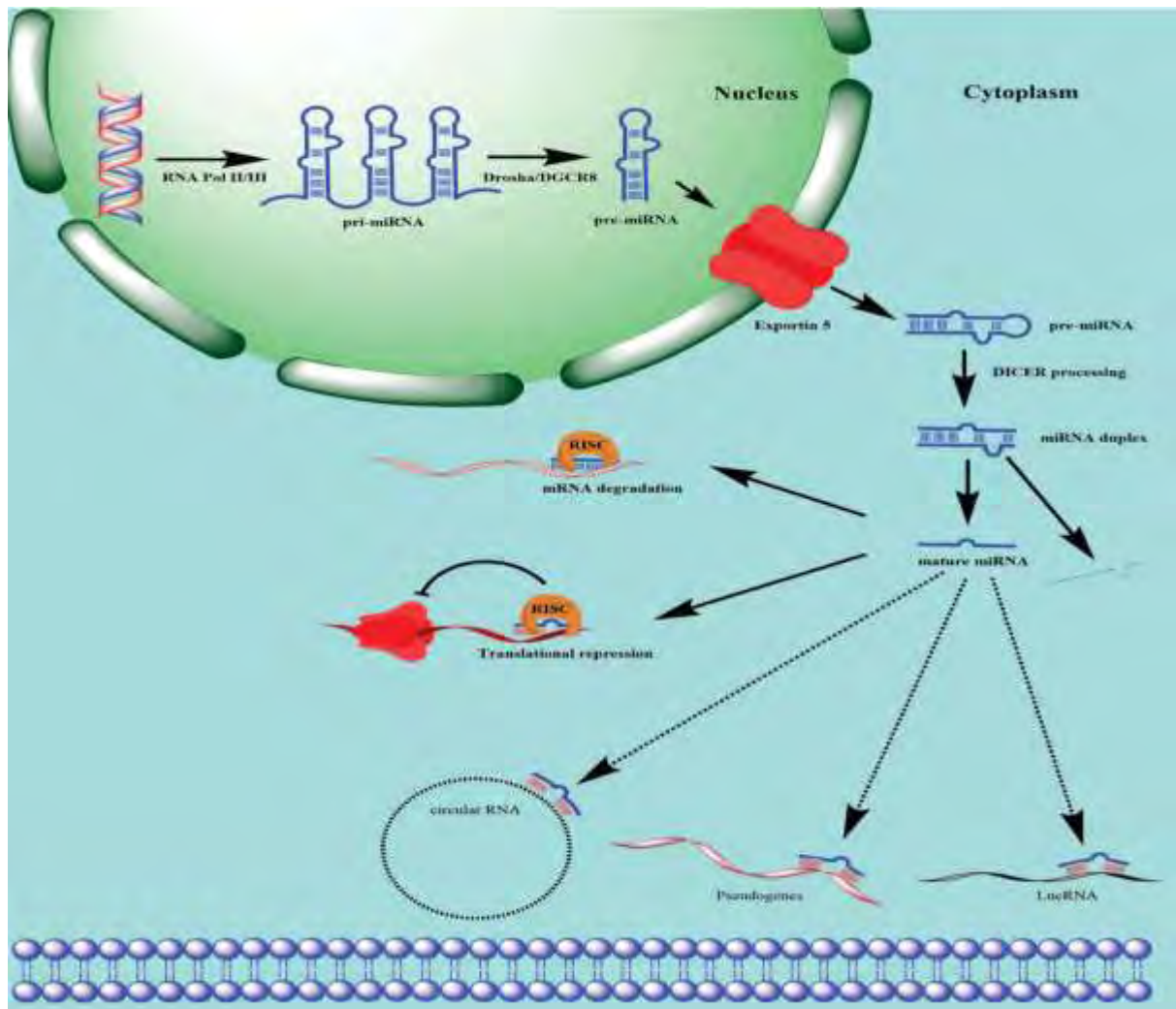
### **3 - microRNAs**

#### **3.1 Εισαγωγικά**

Τα miRNAs είναι μικρού μεγέθους, μονής έλικας RNA αλληλουχίες (συνήθως μήκους 19-23 νουκλεοτιδίων -nts- ) προερχόμενα από πρόδρομα μόρια μεγέθους περίπου 70 nts, τα οποία ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω ποικίλων αναπτυξιακών και φυσιολογικών διαδικασιών. Παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σε ένα σημαντικό αριθμό βιολογικών συστημάτων. (251-254). Στον άνθρωπο ένα miRNA έχει αρκετές δεκάδες ακόμη και εκατοντάδες mRNA στόχους. Πάνω από το 60% των ανθρώπινων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες παρουσιάζουν περιοχές δέσμευσης miRNA (miRNA-binding sites) κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή τους (255). Σύμφωνα με τη miRNA βάση δεδομένων ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), υπάρχουν περισσότερες από 2500 ώριμες miRNA αλληλουχίες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (256,257). Τα miRNAs μεσολαβούν στην αναστολή της έκφρασης των mRNAs στόχων τους και προσδένονται στις ειδικές για αυτά περιοχές δέσμευσης επί των μορίων mRNAs βάσει του κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων. Με την πρόσδεση τους επιτυγχάνεται μεταγραφική αποσταθεροποίηση, ή αναστολή της μετάφρασης (258). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω της πρόσδεσης και με άλλες περιοχές- αλληλουχίες συμπεριλαμβανομένων και εξωνίων και μπορούν να επάγουν τη γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα των θηλαστικών (259-262).

#### **3.2 MiRNA βιογένεση και ωρίμανση**

Η βιογένεση ενός ώριμου μορίου miRNA περιλαμβάνει μία σειρά βιολογικών διαδικασιών (Winter και συν.) (263). Ένα πρωταρχικό miRNA μετάγραφο (pri-miRNA) μεταγράφεται αρχικά στον κυτταρικό πυρήνα από την RNA πολυμεράση II (ή σε ορισμένες περιπτώσεις από την RNA πολυμεράση III), το οποίο στη συνέχεια τέμνεται από το σύμπλοκο Drosha σε ένα 70 nts μήκους μόριο γνωστό ως πρόδρομο miRNA (pre-miRNA) (264-266). Το pre-miRNA στη συνέχεια εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της Exportin-5 (267,268) και φορτώνεται στο DICER, ο βρόχος (loop) στη συνέχεια κόβεται, αποδίδοντας μία διπλής έλικας μοριακή δομή αποτελούμενη από miRNA και από (antisense) αντιθέτου φοράς miRNA (269). Το τελευταίο συνήθως καταστρέφεται, ενώ η μακρά (περίπου 22 nts) μονή αλυσος ώριμου miRNA ενσωματώνεται στο miRNA- σύμπλοκο αποσιώπησης (miRNA-induced silencing complex) (270,271). Η γονιδιακή αποσιώπηση ή η αναστολή της μετάφρασης εξαρτάται από το βαθμό της συμπληρωματικότητας ανάμεσα στο μόριο miRNA και στο RNA μετάγραφο-στόχο (272-275) (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της βιογένεσης των miRNAs - (Citation: Cell Death and Disease (2017) 8, e3045; doi:10.1038/cddis.2017.440 - Official journal of the Cell Death Differentiation Association)

### **3.3 Ρύθμιση των μορίων miRNAs από ανταγωνιστικά (competing) ενδογενή RNAs (ceRNAs)**

Παρόλο που τα miRNAs ασκούν τις λειτουργίες τους μέσω απευθείας δέσμευσης τους με τα στοιχεία απάντησης miRNA (miRNA response elements -MREs-) στα mRNAs στόχους, γίνονται και τα ίδια αντικείμενο ρύθμισης όταν συνδέονται με MRE, τα οποία και περιέχουν μη κωδικά RNA μετάγραφα (γνωστά ως ceRNAs). Τα ψευδογονίδια κυρίως προέρχονται από γονιδιακό διπλασιασμό και μετάλλαξη και επομένως στερούνται της ικανότητας να παράγουν λειτουργική πρωτεΐνη (276). Μία ομάδα ψευδογονιδίων δημιουργείται μέσω mRNA retrotransposition (επεξεργασμένα ψευδογονίδια)(277). Για παράδειγμα, το φωσφατάση-τενσίνη ομόλογο ψευδογονίδιο (PTENP)1, περιέχει πολλές περιοχές MREs στο 3' UTR άκρο ευρισκόμενες στο PTEN και είναι εκείνες που συνήθως χάνονται κατά την καρκινογένεση.

Το PTENP1 έχει αποδειχτεί ότι ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του PTEN μέσω της απομόνωσης των ρυθμιστικών για αυτό miRNAs, όπως το miR-19b και miR-20a (278).

Τα μακρά μη κωδικά μόρια (long noncoding) lncRNAs είναι μια ομάδα μορίων RNA, τα οποία είναι μεγαλύτερα των 200 nts (νουκλεοτιδίων). Παρόλο που αρκετά lncRNAs, συμπεριλαμβανομένων του H19 και του X-inactive ειδικού μεταγράφου, είχαν περιγραφεί αρκετές δεκαετίες πριν, μόλις πρόσφατα έγινε γνωστός ο ρόλος τους στη γονιδιακή ρύθμιση. Για παράδειγμα, το RNA homeobox (HOX) μετάγραφο antisenseRNA (HOTAIR) έχει αποδειχτεί ότι αλληλεπιδρά με το polycomb κατασταλτικό σύμπλοκο 2, το οποίο είναι απαραίτητο για να κατασταλεί η έκφραση του HOXD γονιδίου (279). Επιπλέον, τα lncRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως decoys-δολώματα για να απομονώσουν μόρια miRNAs και να παρεμποδίσουν έτσι τη δέσμευση τους με τα μετάγγραφα στόχους, π.χ. το HOTAIR βρέθηκε ότι ρυθμίζει την έκφραση του HER2 ενεργώντας ως ένας miR-331-3p "sponge-sπόγγος" στο γαστρικό καρκίνο (280).

Τα κυκλικά (circ)RNAs είναι ceRNAs τα οποία παράγονται μέσω αποκοπής των 5' και 3' άκρων του γραμμικού μορίου RNA ως ενδιάμεσα μόρια κατά το μάτισμα (RNA-splicing) (281). Τα circRNA είναι περισσότερο σταθερές μοριακές δομές συγκριτικά με το γραμμικό μόριο και μπορεί να αποδειχτούν πιο αποτελεσματικοί σπόγγοι-sponges RNA. Για παράδειγμα, το ciRS-7 και η φυλο-καθοριστική περιοχή Y λειτουργούν ως σπόγγοι για το miR-7 σε επίπεδο νευρώνων και για το miR-138 στον ορχικό ιστό (282).

### **3.4 Μέθοδοι ανίχνευσης κυκλοφορούντων μορίων miRNA**

Η ακριβής ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs στα σωματικά υγρά αποτελεί ακόμη και σήμερα σημαντική πρόκληση εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού τους και του μικρού τους μεγέθους. Ωστόσο, ποικίλες μέθοδοι έχουν προσφάτως ανακαλυφθεί και έχουν υπερβεί τα αναφερθέντα εμπόδια, παρουσιάζοντας κάθε μία από τις μεθόδους αυτές σημαντικά πλεονεκτήματα αλλά και περιορισμούς. Η ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης (qRT-PCR- quantitative reverse real-time - PCR) χρησιμοποιείται ευρέως και είναι μέθοδος με υψηλή ευαισθησία, η οποία απαιτεί μόνο μικρά ποσά RNA (283). Ένας σημαντικός περιορισμός της qRT-PCR είναι ότι χρησιμοποιείται για να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα ενός καθορισμένου αριθμού miRNAs (συνήθως λιγότερα των 700), δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση μεγάλης κλίμακας.

Οι πλατφόρμες μικροσυστοιχιών (micro arrays platforms) αποτελούν μία εναλλακτική μέθοδο για την ανίχνευση κυκλοφορούντων μορίων miRNAs. Το πλεονέκτημα της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα να ανιχνεύει ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό κυκλοφορούντων μορίων

miRNAs, ενώ βασική αδυναμία της μεθόδου είναι το περιορισμένο εύρος και ανικανότητα που παρουσιάζει στην ανίχνευση μη δηλωθέντων στις βάσεις δεδομένων miRNAs (284).

Η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing) μπορεί να ανιχνεύσει τόσο δηλωμένα όσο και μη δηλωθέντα μόρια miRNAs, παρόλο που για την ενέργεια αυτή απαιτούνται μεγάλα ποσά προς επεξεργασία - αρχικού υλικού και παράγει άφθονο αριθμό δεδομένων τα οποία πρέπει να αναλυθούν μέσω σύνθετων βιοπληροφορικών μεθόδων. Η άμεση ποσοτικοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs έχει γίνει δυνατή κάνοντας χρήση της μεθόδου-πλατφόρμας Nano-StringCounter (285), η οποία βασίζεται σε μία καινοτόμο τεχνολογία ψηφιακού μοριακού barcoding και μας δίνει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του ακριβούς αριθμού αντιγράφων ενός ή περισσοτέρων miRNAs σε ένα βιολογικό δείγμα (286). Ωστόσο, σημαντικός περιορισμός της μεθόδου είναι ότι μπορεί επί του παρόντος να ανιχνεύσει μέχρι και 800 ανθρώπινα miRNAs /ανά πλακίδιο.

### **3.5 Επιλογή δείγματος και επεξεργασία**

Τα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs επηρεάζονται από το είδος του δείγματος και τη μέθοδο εξαγωγής RNA. Ο ανθρώπινος ορός και το πλάσμα είναι τα πλέον συχνά χρησιμοποιούμενα είδη δειγμάτων για την ανίχνευση miRNAs. Η αιμόλυση μπορεί να επηρεάσει την αφθονία και επάρκεια των κυκλοφορούντων miRNAs και για το λόγο αυτό αιμολυμένα δείγματα πρέπει να αποκλείονται στα πλαίσια εξετάσεων ρουτίνας (284). Επειδή, ο ορός είναι λιγότερο επιρρεπής στην αιμόλυση συγκριτικά με το πλάσμα για αυτό και χρησιμοποιείται συχνότερα στη μελέτη των miRNAs. Επιπλέον, επειδή τα miRNAs συνήθως υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος είτε συνδεδεμένα με πρωτεΐνες είτε εντός αποπτωτικών σωματίων ή εξωσωμάτων (exosomes), είναι σημαντικό να επιλεγεί μέθοδος απομόνωσης RNA, η οποία να μπορεί να εξάγει αποτελεσματικά το σύνολο των μορίων miRNAs από το προς εξέταση κλάσμα βιολογικού υγρού. (όπως π.χ. το TRIzol).

## **4 - Ο ρόλος των miRNAs στον καρκίνο του μαστού**

Η απορύθμιση των miRNAs συνδέεται με πολλά ανθρώπινα νοσήματα, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, καρδιαγγειακά νοσήματα, παχυσαρκία-σακχαρώδης διαβήτης, ψυχιατρικά νοσήματα και με την καρκινογένεση. Ποικιλία μηχανισμών μεταξύ των οποίων μεταλλάξεις του DNA (οι οποίες σχετίζονται με γενετικούς τόπους, που βρίσκονται miRNA), ή

επιγενετική αποσιώπηση μπορούν να οδηγήσουν σε τροποποιημένη έκφραση των miRNA στους καρκινικούς όγκους στον άνθρωπο (287,288)

Μελέτες έχουν δείξει ότι, η let-7 υπερεκφράζεται σε διαφοροποιημένους επιθηλιακούς ιστούς και υφίσταται αρνητική-ρύθμιση (downregulation) με ακόλουθη μείωση της έκφρασης τους, κατά την ογκογένεση. Το ανωτέρω miRNA στοχεύει το LIN28 mRNA καθώς και το ίδιο αποτελεί αντίστοιχα στόχο της δράσης του LIN28 (το οποίο προκαλεί αρνητικό ρυθμιστή του let-7)(286,289). Η έκφραση της πρωτεΐνης LIN28 αυξάνεται σημαντικά σε πολλούς όγκους, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού (290). Το let-7 βρέθηκε ότι ρυθμίζει τη λειτουργία των tumor-initiating κυττάρων στον καρκίνο του μαστού (T-IC), στοχεύοντας τη δράση των HRAS και HMGA2 (291).

Η οικογένεια μορίων miR-200 έχει αποδειχθεί ότι παίζει κατασταλτικό ρόλο στην ογκογένεση. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από πέντε μέλη οργανωμένη σε δύο ομάδες (clusters) - cluster 1 (miR-200b/200a/429) και cluster 2 (miR-200c/141), τα οποία και εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 1 και 2 αντίστοιχα (292) και η έκφραση τους καταστέλλεται κατά την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) των καρκινικών κυττάρων. Αυτό αποτελεί το αρχικό βήμα για την ανάπτυξη μεταστατικού δυναμικού του όγκου και σχετίζεται με την αυξημένη διεισδυτικότητα και κινητικότητα των κυτταρικών στοιχείων του καρκίνου του μαστού (293,294). Έχει βρεθεί από μελέτες ότι τα μέλη της οικογένειας miR-200 ρυθμίζουν στα καρκινικά κύτταρα T-IC του καρκίνου του μαστού την έκφραση του BMI1, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλουν το EMT μέσω παρεμπόδισης του συστήματος zinc-fingerE-box binding homeobox (εν συντομία ZEB1) και του ZEB2 (371,372). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μία άλλη μελέτη η οποία έδειξε ότι η τροποποίηση-διαμόρφωση της λειτουργίας του miR-200c στα καρκινικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού επηρεάζει την ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης των κυτταρικών στοιχείων (καρκινικών) (295). Επιπλέον, το miR-200c ρυθμίζει τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα β, ο οποίος και διεγείρει τον σχηματισμό ινών τάσεως (stress fibers) ανεξάρτητα από τον άξονα ZEB/E-Cadherin. μέσω στόχευσης ρυθμιστικών πρωτεϊνικών μορίων FHOD1 (formin homology 2 domain containing) και της εξαρτώμενης από τη φωσφατάση, Mg+2/Mn+2 (PPM)1F (295).

Το miR-10b αρχικά ανακαλύφθηκε ότι αποτελεί ένα ογκογενετικό miRNA σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από μεταστατικές εστίες καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, έχει συνδεθεί με την κακοήγη εξαλλαγή όγκων και με διάφορα είδη καρκινικών όγκων υψηλού κακοήθους δυναμικού. Η έκφραση του παρουσιάζει σημαντική αύξηση σε μεταστατικές εστίες συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης του σε πρωταρχικές εστίες καρκινικών όγκων (297). Το miR-10b απευθείας στοχεύει την έκφραση των γονιδίων του HOXD10 και του Kruppel-like παράγοντα 4 (296,298).

Το miR-21 είναι ένα ογκογενετικό miRNA το οποίο και παρεμποδίζει- καταστέλλει την έκφραση αρκετών ογκοκατασταλτικών γονιδίων και κατ' αυτό τον τρόπο ευνοεί την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την ανάπτυξη διηθητικού και μεταστατικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων.. Το miR-21 είναι ένα από τα πλέον υψηλά εκφραζόμενα miRNA στον καρκίνο του μαστού, η δε ρύθμιση της έκφρασης του (upregulation) σχετίζεται με αύξηση της ανάπτυξης του όγκου και με φτωχή πρόγνωση των ασθενών (299,300). Επίσης, το miR-21 ασκεί τη δράση του σε αρκετούς στόχους όπως η τροπομυοσίνη-1α και το PDCD4 (σχετίζεται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο)(300,301). Το miR-21 επιπλέον, “στοχεύει” το PTEN (302) ευνοώντας έτσι τη σχετιζόμενη με το MCF-7 αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον καρκίνο του μαστού, καθώς επίσης ασκεί δράση έναντι ογκοκατασταλτικών μορίων όπως η όξινο πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 32 (family member A) και του εξαρτώμενου από την ακτίνη SWI/SNF ρυθμιστή της χρωματίνης (sub family A member 4) (303).

Το miR-335, το οποίο παρατηρείται με μειωμένη δράση στον καρκίνο του μαστού, παρεμποδίζει την εμφάνιση μεταστατικών εστιών δρώντας έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Sry-box 4 και της εξωκυττάριας πρωτεΐνης της θεμέλιας ουσίας της tenascin-C (304,305). Η ογκοκατασταλτική λειτουργία του miR-335 συμπεριλαμβάνει μεταξύ άλλων τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και την προώθηση της απόπτωσης, ασκώντας ταυτόχρονα δράση έναντι των BRCA1 ενεργοποιητών όπως ο ινσουλινοειδής (insulin-like growth factor-1) αυξητικός παράγοντας 1, ο υποδοχέας ER-α και η πρωτεΐνη εξειδίκευσης 1 (specificity protein 1), ενώ καταστέλλει τον παρεμποδιστή διαφοροποίησης 4 (306). Αντιθέτως, το miR-301 λειτουργεί ως ένα ογκογόνο miR όσον αφορά στην καρκινογένεση του μαστικού αδένου αφού τροποποιεί-ρυθμίζει τη λειτουργία του PTEN, του κολλαγόνου 2A1, του από τα B-κύτταρα λέμφωμα 2-δεσμαντικού τμήματος 3 (B-cell lymphoma 2-binding component 3) και του fork-headboxF2 (307).

Το miR-155 είναι ένα ακόμη ογκογόνο μόριο miRNA, καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό-αύξηση και επιβίωση (308). Στόχος της δράσης του, αποτελεί το BRCA1 γονίδιο, το οποίο σχετίζεται με το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, τη πρόοδο και έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και αποτελεί καθοριστικό γονίδιο στην καρκινογένεση του μαστικού αδένου (309,310). Άλλα γονίδια που αναλόγως σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού είναι ο καταστολέας της σηματοδοτικής κυτταροκίνης 1 (suppressor cytokine signaling 1) και το forkhead-boxO3a, τα οποία υποεκφράζονται σημαντικά υπό τη δράση του miR-155 (311).

Επιπλέον, στον καρκίνο του μαστού τα επίπεδα του miR-34a είναι σημαντικά μειωμένα γεγονός που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

Επικουρικό ρόλο παίζει και η υπερέκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των πρωτεϊνών SIRT1 και BCL2 (312,313)

Τέλος, συχνά στον καρκίνο του μαστού ειδικά στις μεταστατικές εστίες του εν λόγω όγκου, παρατηρείται απώλεια της δράσης του miR-205 αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του Erb-B2 υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης 3, του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα A καθώς και της ZEB1 και της ZEB2 πρωτεΐνης 9 (314-316).

#### **4.1 miRNAs και ορόσημα στον καρκίνο του μαστού**

##### **4.1.1 Σηματοδοτικά μονοπάτια πολλαπλασιασμού και αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο**

Χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους, ακόμα και χωρίς την παρουσία κάποιου σήματος που να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, τα miRNAs έχουν τη δυνατότητα ρύθμισης τόσο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και του κυτταρικού θανάτου. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση του miR-497 στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού ευθύνεται για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 μέσω στόχευσης της κυκλίνης E1 (239). Η μειωμένη έκφραση miRNAs σε ER αρνητικούς καρκινικούς όγκους μαστού ευθύνεται επίσης τόσο για την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιβίωσης, ενώ η υψηλή έκφραση έχει συνδεθεί με καλύτερη πρόγνωση για HER2 θετικούς όγκους του μαστού (216). Επίσης, η υπερέκφραση των miR-221/222 σε εξαιρετικά διεισδυτικούς όγκους του μαστού από βασικοειδή (basal-like) κύτταρα λειτουργεί ως ένας σημαντικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού μέσω στόχευσης αρκετών σηματοδοτικών μετατροπέων (transducers) και ογκο-κατασταλτικών παραγόντων (πίνακας 4.1).

Επιπροσθέτως, τα miR-221/222 διεγείρουν την εξάπλωση και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού καθώς στοχεύουν το μοριακό μονοπάτι PTEN/Akt (214). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η δράση 33 miRNAs απορυθμίζεται σε MCF-7 πολυκυτταρικά σφαιροειδή (multi cellular spheroids). Τα ανωτέρω miRNAs συνδέονται με την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό. Ιδιαίτερα, τα χαμηλά επίπεδα miR-221-3p καθώς και τα υψηλά επίπεδα του miR-187-3p έχουν συσχετιστεί με την παραγωγή αδρανών κυτταρικών υποπληθυσμών (240). Τέλος, άλλα miRNAs, όπως το miR-26b, το miR-107 αλλά και μέλη της ομάδας (cluster) των miR-195/425 προκαλούν το σχηματισμό κυτταρικών αποικιών, διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1, απόπτωση των καρκινικών κυττάρων αλλά και ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στοχεύοντας σημαντικά μόρια-ρυθμιστές (Πίνακας 2)(213).



#### **4.1.2 Διήθηση και μετάσταση**

Αρκετά miRNAs ρυθμίζουν την ανάπτυξη διηθητικού δυναμικού και το σχηματισμό μεταστατικών εστιών από τα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, η αυξημένη έκφραση των miR-221/222 προάγουν την εμφάνιση του EMT φαινοτύπου των κυττάρων του καρκίνου του μαστού μέσω μείωσης της έκφρασης επιθηλιακών γονιδίων όπως της E-cadherin (241), μέσω απευθείας ρύθμισης της λειτουργίας διαφόρων mRNAs όπως του μεταγραφικού καταστολέα TRPS1 και του υποδοχέα λιποκυτταροκίνης - λιπονεκτίνης ADIPOR1 (πίνακας 4.1). Στη μελέτη τους οι Dentelli και συν., έδειξαν ότι χαμηλή έκφραση των miR-221/222 σε high grade luminal επιθετικά καρκινώματα έχει συσχετιστεί με την υψηλή έκφραση στόχων του όπως η β4 ιντεγκρίνη, η δισιντεγκρίνη και η μεταλλοπρωτεάση-17, οι οποίες είναι απαραίτητες για αποκτήσει ένα κύτταρο διηθητικό φαινότυπο (215). Επιπλέον, στον πίνακα 2 αναφέρονται οι μοριακοί στόχοι των miR-221/222, τα οποία miRNAs έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση μεταστατικών εστιών στον HER2 θετικό καρκίνο του μαστού (215,217-220).

Τέλος η μειωμένη έκφραση των miR-143 και miR-145 συσχετίζεται με την υπερέκφραση του ERBB3 υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης, του Kras, της βιμεντίνης, της MMP3 και της E-καντχερίνης τα οποία έχουν θετικά συσχετιστεί με το μέγεθος του όγκου, το βαθμό κακοήθειας, την ιστολογική διαφοροποίηση του όγκου, το σχηματισμό μεταστατικών εστιών και την υποτροπή της νόσου (221).

#### **4.1.3 Αγγειογένεση**

Τα miRNAs αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της αγγειογένεσης. Στη μελέτη των Tang και συν., φάνηκε ότι ο VEGF (ο ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας) ενισχύει την μεταγραφή του miR-27a μέσω της αύξησης του Run σχετιζόμενου παράγοντα μεταγραφής (RUNX1) στα βλαστικά-ομοιάζοντα καρκινικά κύτταρα του μαστού (BCSLCs). Αντίστοιχα, το miR-27 αυξάνει την έκφραση του ZBTB10 (zinc-finger and BTB-domain containing 10) ενώ προάγει την in vivo αγγειογένεση και μετάσταση (222). Επίσης η έκτοπη έκφραση του miR-155 σε ξενομοσχεύματα θηλαστικών πειραματοζώων είχε ως αποτέλεσμα τη διέγερση της αγγειογένεσης (224). Μάλιστα τόσο η λειτουργία του miR-155, μέσω μείωσης της έκφρασης του ογκο-καταστολέα Von Hippel-Lindau, όσο και η έκφραση του έχουν συνδεθεί με καρκίνο του μαστού τελικού σταδίου (εμφάνιση λεμφαδενικών μεταστάσεων και κακή πρόγνωση για τον ασθενή) (224,242).

Στον αντίποδα, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές ότι miRNAs παρεμποδίζουν την αγγειογένεση. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα έκφραση του miR-200 εμποδίζουν τη λειτουργία προαγγειογενετικών κυτταροκινών κλειδιά (όπως η ιντερλευκίνη 8 και ο CXCL1

σε luminal-like κύτταρα του μαστικού αδένου), ενώ έχουν συσχετιστεί με τη μείωση της αύξησης του όγκου τόσο in vitro όσο και in vivo (223).

#### **4.1.4 Αθανασία αναπαραγωγικού τύπου (replicative immortality)**

Τα φυσιολογικά κύτταρα εμφανίζουν ένα περιορισμένο αναπαραγωγικό δυναμικό εξαιτίας της εμφάνισης της κυτταρικής γήρανσης, κατά την οποία η απώλεια των τελομερών έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Σε αντιδιαστολή, τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν αυτού του φραγμού στον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό μέσω της έκφρασης της τελομεράσης (hTERT), το οποίο αυτό ένζυμο υπερεκφράζεται στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα (243). Σε πρόσφατες μελέτες έχει αναφερθεί σε διαφορετικά είδη καρκινικών κυττάρων η ύπαρξη σχετιζόμενων με την κυτταρική γήρανση miRNAs. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η έκφραση και η δραστηριότητα της hTERT παρεμποδίζεται εξαιτίας της μειωμένης έκφρασης διαφόρων miRNAs (πχ. miR-130-5p, let-7g, miR-133a και miR-491-5p) στην κυτταρική σειρά MCF-7 (225).

Hallmark cancer	miRNA expression		Target
	Up	Down	
Sustaining proliferation	miR-191/425 miR-221/222		EGR1 SOCS1, STAT5A, CDKN1B, PTEN/Akt
Evading growth suppressors		miR-497	CyclinE1, E2F3, Bcl-w, SMAD7, ERα
Resisting cell death		miR-26b miR-107 miR-26a	CDK8, BDNF SIAH1 MCL-1
Metastasis	miR-221/222  miR-29 miR-30c	miR-221/222   miR-143/145	ADIPOR1, TRPS1, ADAM-17 B-Integrin, uPAR 7b, PTEN NIM NOV/CCN3 ERBB3, Kras, Vimentin, MMP9 CXCR4, E-Cadherin
Angiogenesis	miR-27a miR-542-3p miR-200 miR-155	 miR-542-3p miR-200	ZBTB10 Ang2 IL8, CXCL1 VHL
Replicative immortality		miR-138-5p miR-133a miR-9-5p let-7 g	hTERT
Deregulating metabolism	miR-155  miR-122 miR-378* let7a miR-210	  miR-34a	C/EBPβ LDHA PK ERRγ GABPA ISCU
Avoiding immune destruction	miR-373 miR-10b miR-20a		MiCB
Genome instability	miR-155 miR-182 miR-193b miR-1255b		TERF1 FOXO3a BRCA1
Inflammation		miR-146b	NFKB
Stem-cell Phenotype	miR-10b		PTEN

Πίνακας 2: Edna Ayerim Mandujano-Tinoco et al - Breast Cancer Research and Treatment  
<https://doi.org/10.1007/s10549-018-4850-7>

#### **4.1.5 Κυτταρικός μεταβολισμός (energetics)**

Ο κακοήθης μετασχηματισμός έχει ισχυρά συσχετιστεί με αυξημένη γλυκόλυση υπό αερόβιες συνθήκες, μεγάλη πρόσληψη γλυκόζης και μερική βλάβη του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OxPhos), καθώς οι όγκοι αποτελούνται από γλυκόζη εξαρτώμενους και

OxPhos εξαρτώμενους κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Τα miRNAs μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του μαστού, το miR-155 αυξάνει την έκφραση της χεξοκινάσης II (ένζυμο κλειδί που συμμετέχει στη γλυκόλυση). Το miR-155 προάγει την ενεργοποίηση του STAT3 (ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή του HKII) και στοχεύει τη δράση του EBPβ (ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή του miR-143), το οποίο στη συνέχεια μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του HKII (226). Επίσης, αυξάνονται σημαντικά ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης, η παραγωγή γαλακτικού οξέος, και τα επίπεδα έκφρασης των GLUT1, PFK2, PGM1, PKM2, PDK1 και LDHA μέσω της δραστηριότητας του miR-155. Επιπροσθέτως, το miR-155 παρουσιάζει αντι-γλυκολυτική δράση με αποτέλεσμα να εμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου (244)(πίνακας 4.1).

Όσον αφορά, στο μεταβολισμό των μιτοχονδρίων έχει παρατηρηθεί ότι, τα miR-378-3p, miR-210 και το let7a ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων κλειδιά του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος και του μιτοχονδριακού συμπλέγματος (complex) I. Τα ανωτέρω miRNAs ευθύνονται για τη μείωση της μιτοχονδριακής αναπνοής καθώς και για την αύξηση της παραγωγής ROS και του οξειδωτικού στρες σε κυτταρικές σειρές από μεταστατικές εστίες καρκίνου του μαστού (227-229).

#### **4.1.6 Ανοσιακή απάντηση - καρκίνος του μαστού**

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς μπορούν απευθείας να σκοτώνουν καρκινικά κύτταρα. Ένας σημαντικός υποδοχέας - ενεργοποιητής, που μεσολαβεί στην ανωτέρω λειτουργία, είναι ο NKG2D, ο οποίος αναγνωρίζει διαφορετικά stress-induced σύμπλοκα (πχ. MiCA και MiCB - σημαντικά σύμπλοκα ιστοσυμβατότητας τάξης I - αλυσίδας A και B σχετιζόμενα). Η έκφραση των συμπλόκων NKG2D ρυθμίζεται από τα καρκινικά κύτταρα με σκοπό να αποφύγουν την καταστροφή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η έκφραση των ανωτέρω συμπλόκων ρυθμίζεται από miRNAs, όπως το miR-373 και miR-10b, τα οποία συνδέονται με την 3'UTR του MiCB, μειώνοντας την έκφραση του (230). Στον καρκίνο του μαστού, miRNAs που ανήκουν στην ομάδα του miR-17-92 (συμπεριλαμβανομένου και του miR-20a) στοχεύουν την 3'UTR περιοχή των MiCA/B και παρεμποδίζουν την μεσολαβούμενη από τα κύτταρα φυσικούς φονείς κυτταροτοξικότητα (231).

#### **4.1.7 Γενωμική αστάθεια και μεταλλάξεις**

Η απορύθμιση της έκφρασης miRNAs μπορεί να προκληθεί από ενίσχυση (amplification) του γενώματος, διαγραφές και από χρωμοσωμικές μεταθέσεις (245). Η σύνδεση των miRNA

γονιδίων με εύθραυστες περιοχές του ανθρώπινου γενώματος, προτείνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού (vicious circle-like) βάσει του οποίου οι τροποποιήσεις στην έκφραση των miRNAs, που οφείλονται σε γεγονότα γενωμικής αστάθειας, μπορούν να προκαλέσουν περισσότερη γενετική αστάθεια (μέσω μηχανισμών που ευνοούν την εμφάνιση βλαβών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, κατά τη μίτωση, ή κατά την επιδιόρθωση του DNA (246).

Στον καρκίνο του μαστού παρατηρούνται διαφορετικά μοτίβα γενωμικών τροποποιήσεων (247,248). Για το λόγο αυτό μερικές μελέτες επικεντρώνονται στη συμμετοχή των miRNAs στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πρόκληση γενωμικής αστάθειας. Επιπροσθέτως, η υπερέκφραση του miR-155 έχει συνδεθεί με αύξηση της γενωμικής αστάθειας σε ασθενείς με ER+ και φτωχής πρόγνωσης καρκίνο του μαστού (232). Το miR-155 προκαλεί βλάβη στη συνοχή των τελομερών και μειώνει την έκφραση του TRF1 (telomeric repeat-binding factor 1) και του FOXO3a (232,233). Επίσης, τα miR-182, miR-193b και miR-1255b μπορούν να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια, καθώς στοχεύουν την έκφραση των γονιδίων BRCA1/2 σε κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού, οι οποίες στη συνέχεια ευθύνονται για ανωμαλίες στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (234-236).

#### **4.1.8 Προαγωγή της φλεγμονής από τα κύτταρα του όγκου**

Η σχετιζόμενη με τον όγκο φλεγμονώδης απάντηση ενισχύει την ογκογένεση μέσω της προμήθειας βιοενεργών μοριακών ενώσεων (bioactive molecules) εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Πρόσφατα, προτάθηκε η ύπαρξη ενός μοριακού κύκλου, στον οποίο ένα miRNA διατηρεί ενεργό τη φλεγμονώδη απάντηση στον καρκίνο του μαστού (237). Το ανωτέρω αφορά τη μείωση της έκφρασης του miR-146b εξαιτίας της μεθυλίωσης του προωθητή του miR-146b και τη μόνιμη ενεργοποίηση του STAT3 σε πρωτοπαθείς εστίες καρκίνου του μαστού. Αντίθετα, σε φυσιολογικά επιθηλιακά, το miR-146b παρεμποδίζει την παραγωγή ιντερλευκίνης-6 (εξαρτώμενης από τον πυρηνικό παράγοντα κB -- NF-κB--) και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση του STAT3 (237).

#### **4.1.9 Φαινότυπος βλαστικών κυττάρων**

Τα BCSCs κατέχουν μοναδικά miRNAs - υπογραφές (249). Διαφορετικά miRNAs (πχ. τα miRNAs της οικογένειας του let-7) έχει βρεθεί ότι εκφράζονται διαφοροποιημένα σε BCSCs σε σύγκριση με (μη βλαστικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού) NBC-SCs (250). Σε άλλη έρευνα μελετήθηκε η έκφραση 353 miRNAs σε CSCs σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Μεταξύ αυτών, το miR-10b φάνηκε ότι αποτελεί ένα σημαντικό

ρυθμιστή της αυτο-ανανέωσης των BCSCs και της έκφρασης stemness-δεικτών. Το ανωτέρω επιτεύχθηκε μέσω της διατήρησης ενεργού του AKT μονοπατιού και της μείωσης της έκφρασης του PTEN (238).

#### **4.2 Τα κυκλοφορούντα miRNAs ως βιοδείκτες**

Τα εξωκυττάρια κυκλοφορούντα miRNAs, υπάρχουν συνήθως δεσμευμένα με ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα ή υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες ή μπορεί απελευθερωθούν από τα κύτταρα εντός λιποκυστιδίων, μικροκυστιδίων, εξοσωμάτων ή αποπτωτικών σωματίων (317-320). Τα λιποκυστίδια και τα εξοσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία (320,321). Έτσι, στα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs αντανακλάται η ομοιοστατική απάντηση του ανθρώπινου οργανισμού, ενώ συγχρόνως αποτελούν σημάδια της εξέλιξης μίας νόσου. Τα κυκλοφορούντα miRNAs ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα καθώς και στα άλλα ανθρώπινα βιολογικά υγρά (322-324). Χάριν στη μοριακή σταθερότητα τους και αντίσταση τους στη δραστηριότητα της ενδογενούς RNase, αυτά τα miRNAs έχουν προταθεί ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες για νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, νευρολογικές διαταραχές, κακοήθειες και για τον καρκίνο του μαστού (325-328). Χαρακτηριστικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι αυξημένα επίπεδα στον ορό του miR-21 και του miR-210 παρατηρούνται σε πάσχοντες από διάχυτου τύπου λέμφωμα από μεγάλα B κύτταρα. Αυξημένα δε επίπεδα διαφόρων miRNAs αναφέρονται στη βιβλιογραφία ότι συνδέονται με διαφορετικούς τύπους καρκίνου - για παράδειγμα, το miR-141 στον καρκίνο του προστάτη αδένος, τα miR-25 και miR-126 στον καρκίνο του πνεύμονα, τα miR-21, miR-92, miR-93, miR-126 και miR-26a στον καρκίνο των ωοθηκών, τα miR-92 και miR-17-3p στον ορθοκολικό καρκίνο, το miR-92a στην οξεία λευχαιμία, τα miR-210, miR-21, miR-155 και miR-196a στον παγκρεατικό καρκίνο, το miR-184 στο εκ πλακώδους επιθηλίου καρκίνωμα της γλώσσας και το miR-500 στο ηπατοκυτταρικό καρκίνο (329-335).

MIRNA	Cancer type	Regulation
Mir-21 and -210	B-cell lymphoma	Up
MIR-141	Prostate cancer	Up
MIR-25 and -223	Lung cancer	Up
MIR-21, -92, -93, -126, and -29a	Ovarian cancer	Up
MIR-17-3p and -92	Colorectal cancer	Up
MIR-92a	Acute Leukemia	Up
MIR-210, -21, -155, and -196a	Pancreatic cancer	Up
MIR-184	Squamous cell carcinoma	Up
MIR-500	Hepatocellular carcinoma	Up

Πίνακας 3: Λίστα επιλεγμένων miRNAs σε διάφορους καρκίνους στον ανθρώπινο πληθυσμό  
– ((Citation: Cell Death and Disease (2017) 8, e3045; doi:10.1038/cddis.2017.440 - Official journal of the Cell Death Differentiation Association))

### **4.3 Τα κυκλοφορούντα miRNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες**

Στη μελέτη των Heneghan και συν. (336), αξιολογήθηκε το διαγνωστικό δυναμικό μιας σειράς από επτά miRNAs - σχετιζόμενα με κακοήθειες - στην κυκλοφορία του αίματος πασχόντων από διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Οι μελετητές έδειξαν ότι τα επίπεδα των let-7a, miR-10b και miR-155 ήταν αυξημένα στην πλειοψηφία των καρκινοπαθών που μελετήθηκαν, ενώ τα επίπεδα του miR-195 ξεχώρισαν στην κυκλοφορία του αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με άλλους καρκινικούς τύπους και με την ομάδα control της μελέτης (ευαισθησία 88% και ειδικότητα 91%). Η ευαισθησία αυξήθηκε περισσότερο έως και 94%, όταν στη μελέτη μετρήθηκαν στους ασθενείς ταυτόχρονα τα κυκλοφορούντα επίπεδα των let-7a, miR-155 και miR-195. Σε μία μελέτη κοόρτης σε πάσχοντες από καρκίνο του μαστού διερευνήθηκε το διαγνωστικό δυναμικό μίας ομάδας κυκλοφορούντων miRNAs, των οποίων η δράση στοχεύει το PTEN όγκο-καταστολέα, κάνοντας χρήση qRT-PCR. Τα προεγχειρητικά επίπεδα των κυκλοφορούντων miR-20a και -21 ήταν αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και καλοήγη νοσήματα του μαστού συγκριτικά με την ομάδα υγιών ατόμων - control, ενώ τα επίπεδα του miR-214 στην κυκλοφορία του αίματος ήταν διακριτά σαφώς μεταξύ κακοήθων - καλοηθών όγκων και υγιών ατόμων (337).

Σε μελέτη των Cuk και συν., (338) διερευνήθηκε το διαγνωστικό δυναμικό επτά κυκλοφορούντων miRNA (miR-127-3p, miR-148b, miR367a, miR367c, miR-409-3p, miR-652 και miR-801) σε δυο “κοόρτες” αποτελούμενες από ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Οι συγγραφείς παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα των υπό μελέτη miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος ασθενών με αιματολογικές νεοπλασίες. Τα miR-127-3p, miR-148b, miR-409-3p, miR-652 και miR-801 ανιχνεύθηκαν στα στάδια I και II του καρκίνου του μαστού, στοιχείο που δείχνει ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί βιοδείκτες για τα αρχικά στάδια της νόσου. Σε άλλη μελέτη διερευνήθηκε η έκφραση διαφόρων miRNA σε δείγματα πλάσματος αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με ομάδα υγιών - control, η οποία έδειξε ότι 43 miRNAs είχαν διαφοροποιημένη έκφραση ανάμεσα στις δύο ομάδες της μελέτης. Οι ασθενείς παρουσίασαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα των miR-148b, miR-133a και miR-409-3p. Τα miR-148b και miR-133a ανιχνεύθηκαν επιπλέον σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, γεγονός που δείχνει τη σχέση και προέλευση τους από τον όγκο (340). Σε παρόμοια μελέτη -miRNA profiling- μελετήθηκαν (σε μεγάλο δείγμα ασθενών παγκοσμίως) τα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

αρχικού σταδίου με ER-θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων- και σε ομάδα υγιών ατόμων (control group). Από τη μελέτη ταυτοποιήθηκε μία ομάδα από εννέα miRNAs (τα miR-15a, miR-18a, miR-107, miR-133a, miR-139-5p, miR-143, miR-145, miR-365 και miR-425), τα οποία επίπεδα των οποίων σαφώς διακρίνονταν μεταξύ των καρκινοπαθών ασθενών και του control group των υγιών ατόμων. Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με μία μεταγενέστερη έρευνα-μελέτη κοόρτης ασθενών με καρκίνο του μαστού αρχικού-πρώιμου σταδίου (341). Σε έτερη μελέτη, στην οποία έγινε χρήση της πλατφόρμας Taqman χαμηλής πυκνότητας μικροσυστοιχιών (low density array), έγινε σύγκριση ασθενών με πρώιμου σταδίου καρκίνο του μαστού και υγιών ατόμων και βρέθηκε ότι τα επίπεδα στην κυκλοφορία του miR-484 ήταν πολύ αυξημένα στους πάσχοντες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από μία άλλη μελέτη κοόρτης στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου (342).

Παρόλο που οι προαναφερθείσες μελέτες περιλάμβαναν ένα σχετικά μετρίου μεγέθους αριθμό ασθενών, ο Shimomura και συν., (343) στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν ορούς από μία κοόρτη 1280 ασθενών με καρκίνο του μαστού, 2836 υγιή άτομα (controls), 451 ορούς από πάσχοντες από άλλους τύπους καρκίνου και ορούς από 63 άτομα με καλοήγη νοσήματα που δεν σχετίζονταν με το μαζικό αδένα. Οι μελετητές ξεχώρισαν μία ομάδα από πέντε miRNAs (τα miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-3p και miR-6875-5p) των οποίων τα επίπεδα στον ορό των ασθενών από καρκίνο του μαστού διέφεραν σημαντικά συγκριτικά με τις άλλες ομάδες που μελετήθηκαν.

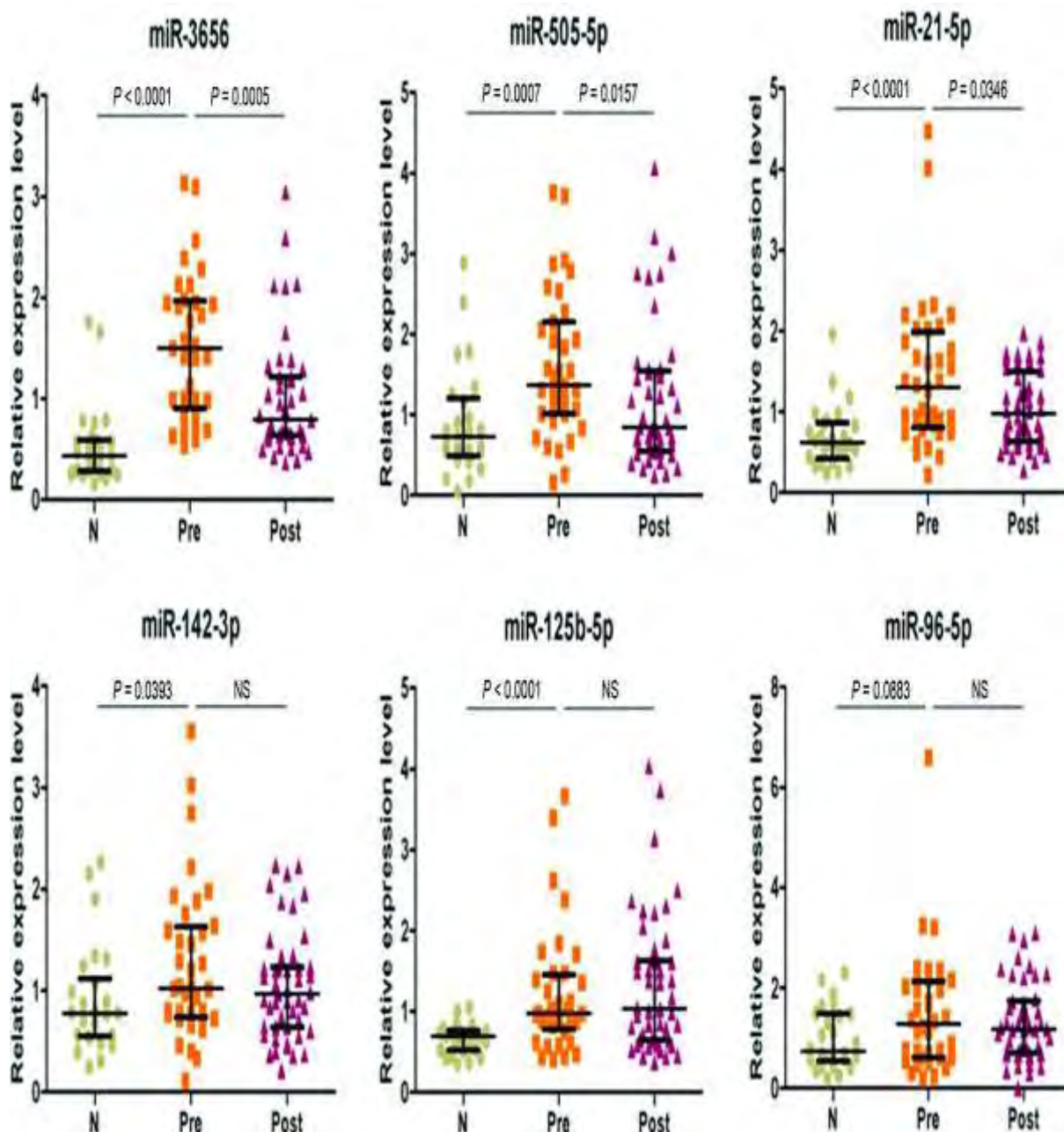
Πρόσφατη μελέτη (344) έδειξε ότι τα επίπεδα στον ορό ήταν αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου σε σχέση με υγιή άτομα τη στιγμή της διάγνωσης, καθώς επίσης ήταν πιο αυξημένα σε ασθενείς υψηλού ρίσκου και λιγότερο στους ασθενείς μικρού κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η έκφραση των miR-155, miR-181b και miR-24 μειώθηκε κατόπιν χειρουργικής εκτομής του όγκου, ενώ αντίστοιχα η έκφραση του miR-19a μειώθηκε μετα-θεραπευτικά.

Ωστόσο, σαφής περιορισμός των ανωτέρω αναφερομένων μελετών και ερευνών είναι ότι η προέλευση των ανιχνεύσιμων στην κυκλοφορία miRNAs δεν επιβεβαιώνεται και συγκεκριμένα δεν είναι γνωστή η συμμετοχή-συμβολή ιστού από καρκίνο του μαστού στην ταυτοποίηση των κυκλοφορούντων miRNAs από καρκινικούς ιστούς. Μία ομάδα ερευνών εξέτασε τη σχέση μεταξύ της έκφρασης επιλεγμένων κυκλοφορούντων miRNAs σε ιστούς προερχόμενους από εστίες καρκίνου του μαστού και εξέτασε τη συσχέτισή τους με τα κυκλοφορούντα miRNAs. Συλλέχτηκαν δείγματα ιστού και ορού από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και από υγιή άτομα (control) και φάνηκε αξιοσημείωτη απορρύθμιση της έκφρασης αρκετών miRNAs τόσο σε επίπεδο καρκινικού ιστού όσο και στην κυκλοφορία του αίματος. Ιδιαίτερα, τα miR-1, miR-92a, miR-133a και miR-133b ήταν από τους πλέον



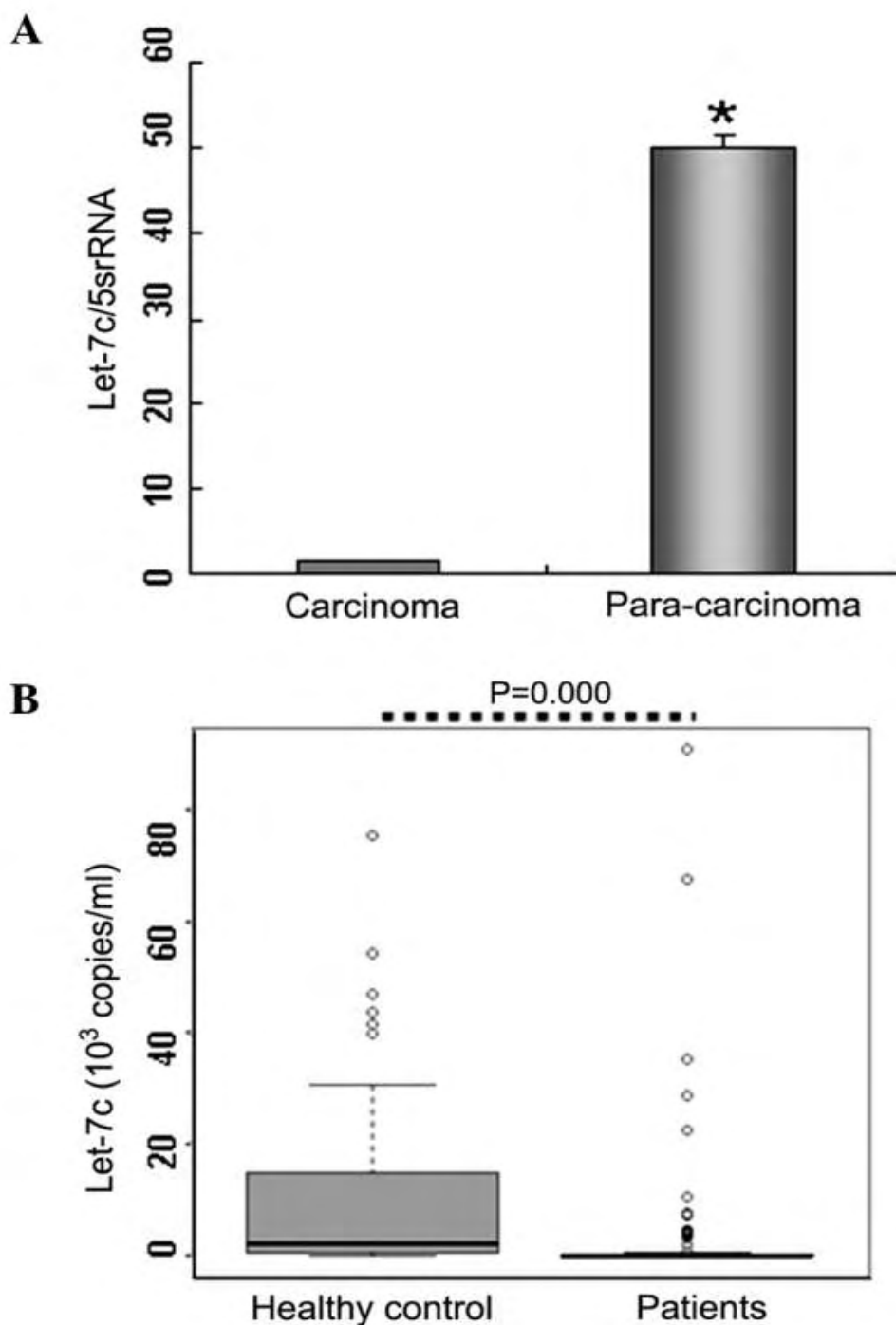
εξέχοντες διαγνωστικούς βιοδείκτες στον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού, οι οποίοι παρουσίασαν σημαντική αύξηση της έκφρασης τους. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από μία ανεξάρτητη κοόρτη ασθενών με καρκίνο του μαστού (345).

Στη μελέτη των Matamala και συν. (346), χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστού σκηνωμένου σε κύβους παραφίνης από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και δείγματα από υγιή άτομα (controls), ενώ μελετήθηκαν δύο ανεξάρτητες κοόρτες, η μία αφορούσε σε ασθενείς και άλλη σε υγιή άτομα της μελέτης. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι τέσσερα miRNAs (τα miR-505-5p, miR-125-5p, miR-21-5p και miR-96-5p) εμφάνισαν σημαντική αύξηση της έκφρασης τους τόσο στον ιστό όσο και στην κυκλοφορία του αίματος προθεραπευόμενων ασθενών με καρκίνο του μαστού.(Εικόνα 12)



Εικόνα 12: Επίπεδα έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs, τα οποία έχουν απορυθμιστεί, στο πλάσμα 36 ασθενών με καρκίνο του μαστού πριν τη χορήγηση αγωγής σε σύγκριση με 26 υγιή άτομα (control) ([Clin Chem.](#) 2015 Aug;61(8):1098-106. doi: 10.1373/clinchem.2015.238691. Epub 2015 Jun 8).

Στη μελέτη δε των Li και συν. (347), αξιολογήθηκε η έκφραση του Let-7c σε καρκινικό ιστό από μαζικό αδένα συγκριτικά με παρακείμενο παρα-καρκινικό ιστό (control). Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση των επιπέδων του Let-7c σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα ανωτέρω ευρήματα από τους ιστούς επιβεβαιώθηκαν μεταγενέστερα σε ορό αίματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, στους οποίους τα επίπεδα του Let-7c ήταν σημαντικά χαμηλότερα συγκριτικά με εκείνα των υγιών ατόμων (control) (Εικόνα 13)



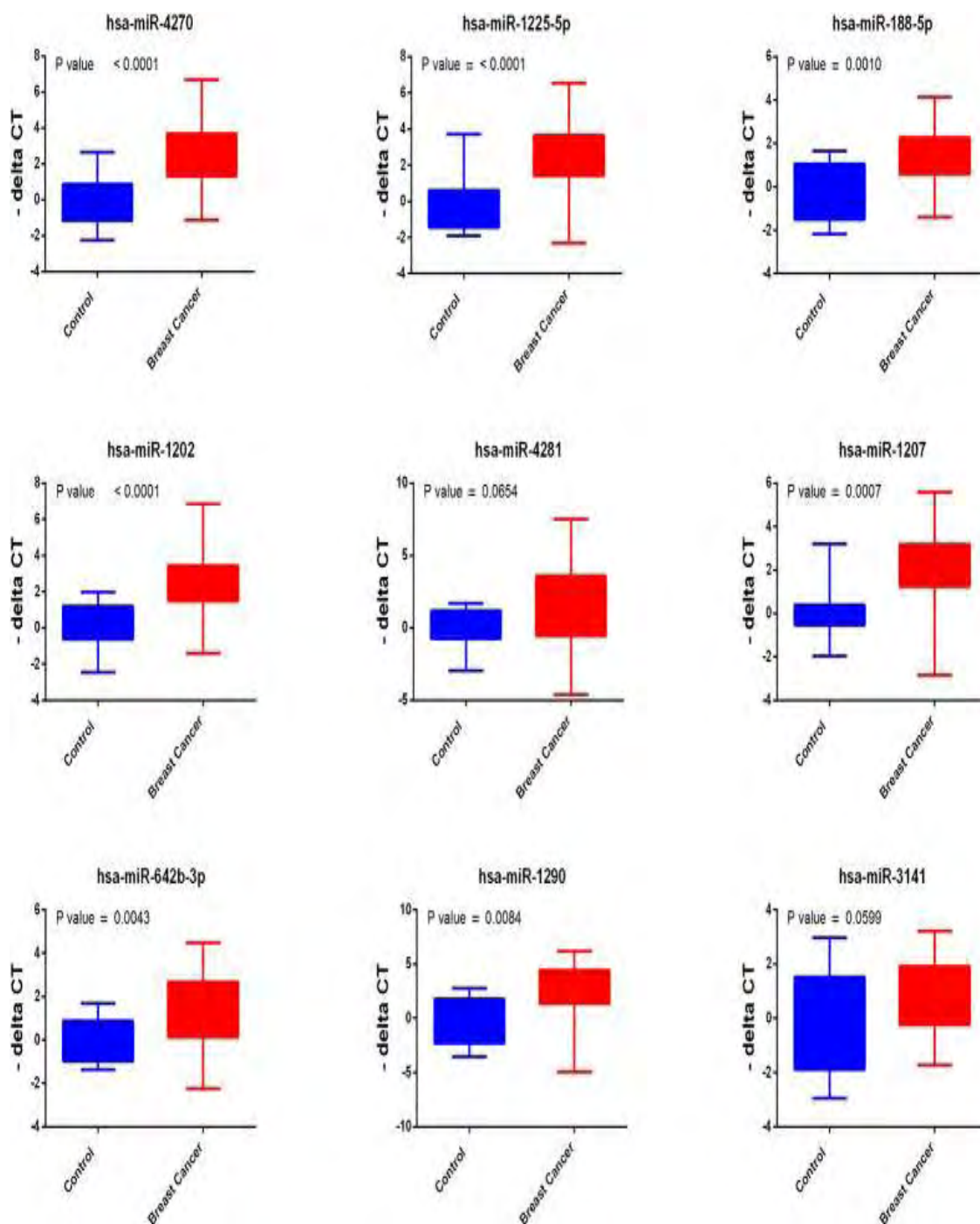
Εικόνα 13: (Α) Ανίχνευση επιπέδων let-7c σε δείγματα ιστού και (Β) ανίχνευση επιπέδων let-7c σε ορό αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού και σε υγιή άτομα ([Oncol Lett.](#) 2015 Mar; 9(3): 1207–1212).

Οι Wang και συν. (348), αξιολόγησαν το διαγνωστικό δυναμικό του κυκλοφορούντος miR-182 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Μέσω qRT-PCR, εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα miR-182 στον ορό των ασθενών με καρκίνο του μαστού και όχι των υγιών, ενώ ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και σε επίπεδο ιστού. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το miR-182 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας εν δυνάμει διαγνωστικός βιοδείκτης. Στις προαναφερθείσες

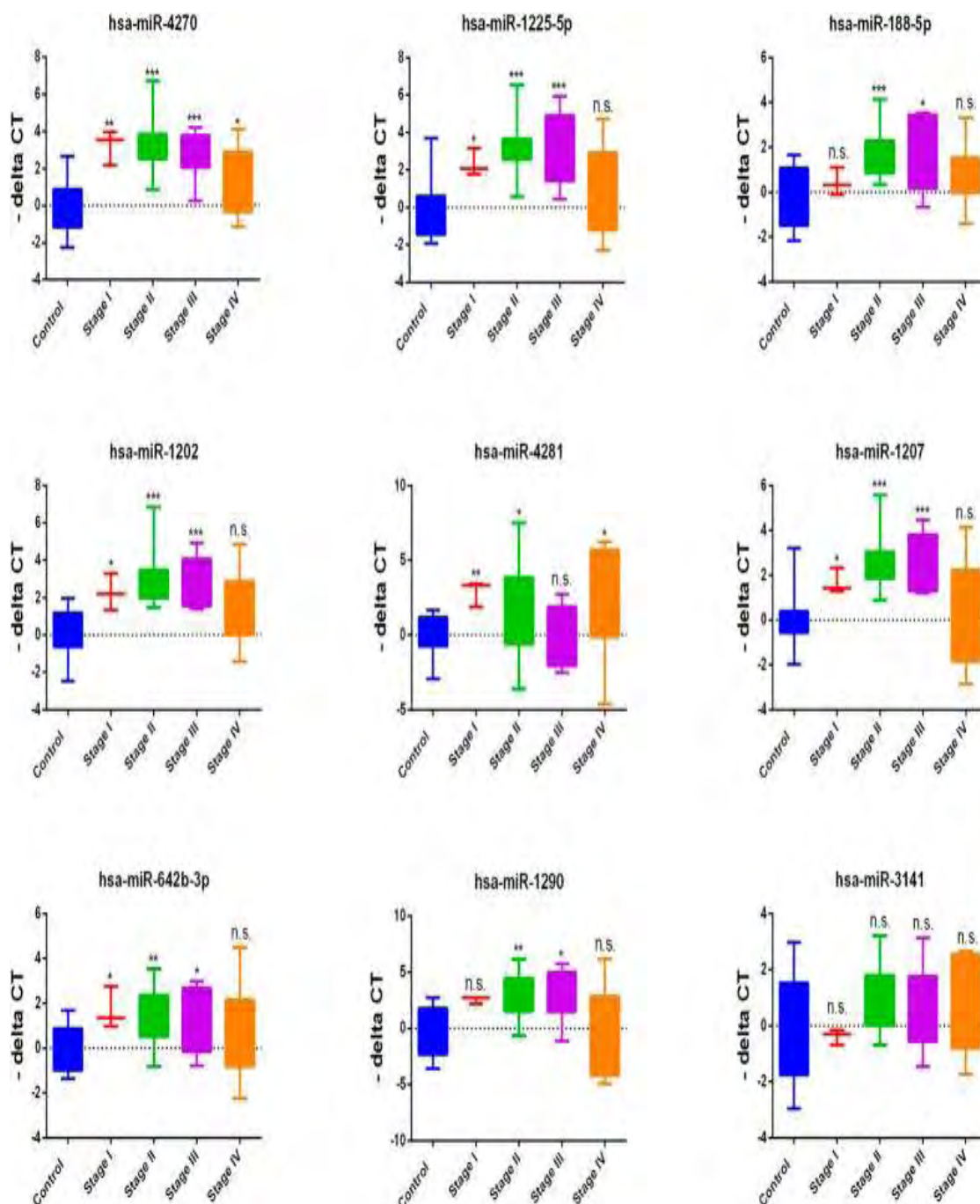
μελέτες, παρατηρήθηκε συμφωνία όσον αφορά τα αποτελέσματα μεταξύ των ανιχνεύσιμων μορίων miRNAs τόσο στον καρκινικό ιστό όσο και στην κυκλοφορία του αίματος, παρόλα αυτά σε ορισμένες μελέτες τα κυκλοφορούντα miRNAs αφορούσαν μη καρκινικές βλάβες. Στην εργασία των Waters και συν. (349), χρησιμοποιήθηκε καρκινικό ιστός μαζικού αδένου από τρωκτικά (ποντίκια) για να αξιολογηθούν μεταβολές των κυκλοφορούντων επιπέδων miRNAs παράλληλα με την εξέλιξη του όγκου. Συγκεκριμένα, με βάση τα αποτελέσματα από τρωκτικά που είχαν δέκτες μοσχεύματος για καρκίνο του μαστού τα επίπεδα του miR-138 παρουσίασαν αύξηση, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και σε μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε ορούς ασθενών με καρκίνο του μαστού (349).

Επιπροσθέτως στη μελέτη κοόρτης των Zhu και συν. (350) σε υγιή άτομα και πάσχοντες από καρκίνο του μαστού εξετάστηκαν τα miR-16, miR-145 και miR-155. Παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση αυτής της ομάδας miRNAs για τον καρκίνο του μαστού, το miR-155 βρέθηκε ότι παρουσίασε υπερέκφραση σε (PR+) ασθενείς με θετικούς προγεστερονικούς υποδοχείς όσον αφορά στα καρκινικά στοιχεία του μαζικού αδένου. Σε άλλη μελέτη των Wang και συν. (351) συσχετίστηκε η έκφραση ενός επιλεγμένου πάνελ miRNAs σε ιστούς από καρκίνο του μαστού σε αντιπαραβολή με δείγματα ορού. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των miR-21, miR-106a και miR-155, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των miR-126, miR-199a και miR-335 όπως αυτά μετρήθηκαν σε δείγματα ιστού πασχόντων από καρκίνο του μαστού και υγιών ατόμων. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι έγινε προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης στην κυκλοφορία του αίματος των miR-21, miR-126, miR-155, miR-199a και του miR-335 με το ιστολογικό στάδιο του όγκου (tumor grading) καθώς και με τους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς επί των καρκινικών στοιχείων του όγκου.

Σε πρόσφατη μελέτη οι ερευνητές κατάφεραν στα πλαίσια μελέτης μεγάλης κλίμακος - global expression profiling - για miRNAs στον καρκίνο του μαστού να ταυτοποιήσουν ένα πάνελ-ομάδα αποτελούμενη από εννέα miRNAs (miR-4270, miR-1225-5p, miR-188-5p, miR-1202, miR-4281, miR-1207-5p, miR-642-3p, miR-1290 & miR-3141) των οποίων η έκφραση παρουσίαζε σημαντική αύξηση στον καρκίνο του μαστού και κατέστη δυνατόν να συσχετιστεί τόσο με το στάδιο του όγκου όσο και με τον μοριακό υπότυπο αυτού (284) (Εικόνα 14-15-16).

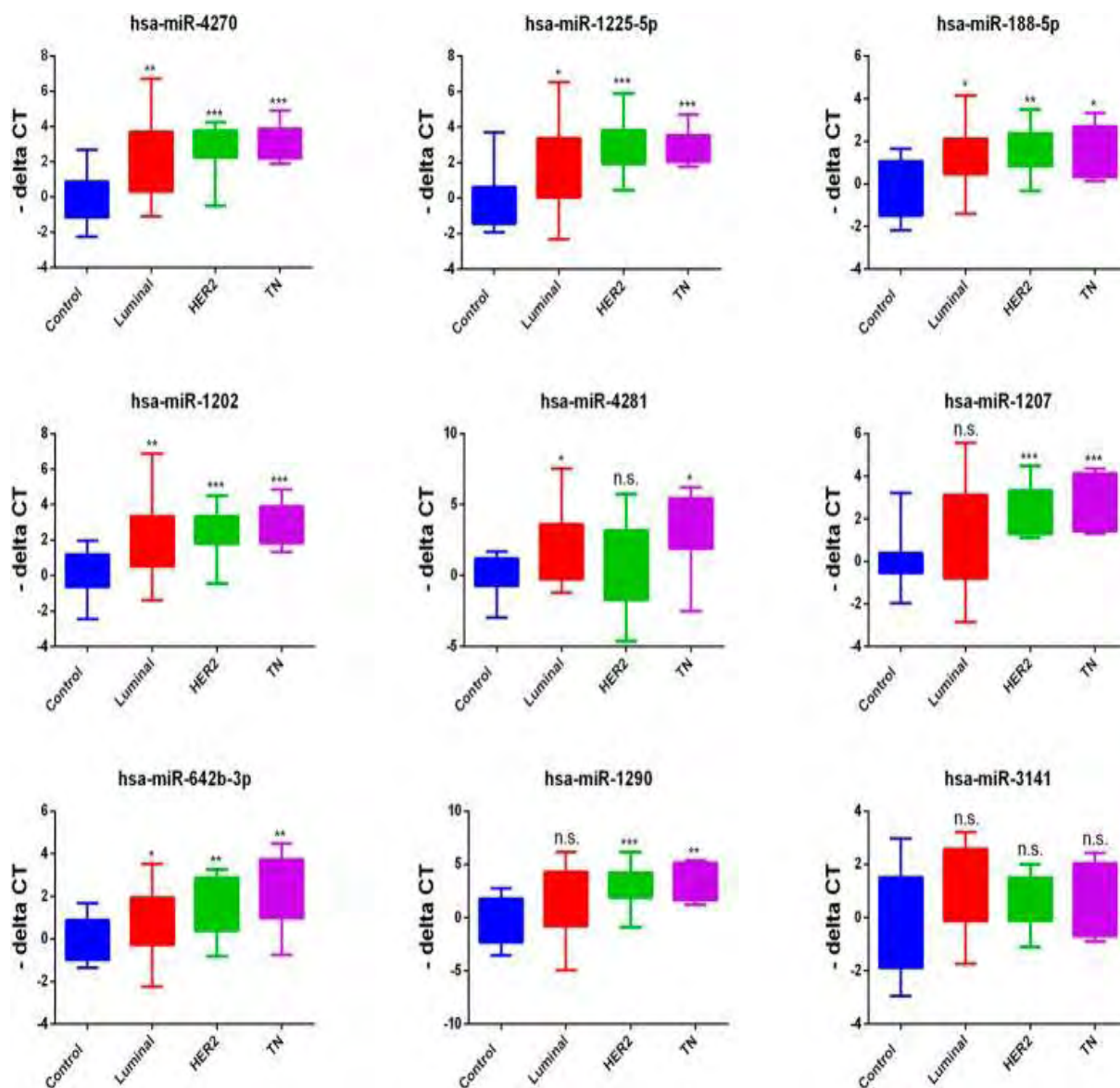


Εικόνα 14: Επιβεβαίωση της έκφρασης (με RT-PCR) των εννέα miRNAs σε ορό αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού (n=46) και σε υγιή άτομα (n=46) (τα miRNAs είχαν προηγουμένως ταυτοποιηθεί με τη χρήση μικροσυστοιχιών) (Hamam et al, [Sci Rep](#). 2016 May 16;6:25997. doi: 10.1038/srep25997).



Εικόνα 15: Επίπεδα έκφρασης των εννέα miRNAs σε διαφορετικά στάδια της νόσου - καρκίνου του μαστού (Hamam et al, [Sci Rep.](#) 2016 May 16;6:25997. doi: 10.1038/srep25997).





Εικόνα 16: Επίπεδα έκφρασης των εννέα miRNAs στους διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους του καρκίνου του μαστού (Hamam et al, [Sci Rep](#). 2016 May 16;6:25997. doi: 10.1038/srep25997).

#### **4.4 Τα κυκλοφορούντα miRNAs ως προγνωστικοί βιοδείκτες**

Τα κυκλοφορούντα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως προγνωστικοί βιοδείκτες σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Κάθε προγνωστικός βιοδείκτης θα πρέπει να υποδεικνύει την έκβαση της ασθένειας ενός ατόμου, για παράδειγμα την εξέλιξη της νόσου, επιπλοκές και επανεμφάνιση αυτής, ανεξαρτήτως της θεραπείας που έχει χορηγηθεί. Σε μία μελέτη, τα επίπεδα στον ορό αίματος αντιγόνων σχετιζομένων με το μελάνωμα (τα melanoma-associated antigen A1 -A2 και A12), του παράγοντα δέσμευσης CCCTC-bindingfactor-like mRNA καθώς επίσης του let-7b ήταν αυξημένα σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνο του μαστού συγκριτικά με ασθενείς πάσχοντες από μη διηθητικούς όγκους, από καλοήγη νοσήματα του μαστού ή άτομα υγιή (control group). Σε αυτή τη μελέτη, η υπερέκφραση του miR-202 συσχετίστηκε θετικά με μειωμένη συνολικά επιβίωση των ασθενών (352).

Στη μελέτη των Mangolini και συν. (353), στην οποία έγινε χρήση της μεθόδου droplet digital-PCR, αξιολογήθηκε η προγνωστική αξία πέντε κυκλοφορούντων miRNAs (miR-10b-5p, miR-145-5p, miR-148-3p και του miR-652-3p). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα στον ορό των μορίων miR-148b-3p και miR-652-3p ήταν χαμηλότερα, ενώ η υψηλή έκφραση του miR-10b-5p συσχετίστηκε με φτωχή πρόγνωση στις δύο κοόρτες πασχόντων από καρκίνο του μαστού. Σε έτερη μελέτη διερευνήθηκε η προγνωστική αξία των κυκλοφορούντων miRNAs σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC - triplenegativebreastcancer). Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιώντας ορό από ασθενείς με TNBC (η μελέτη διεξήχθη στη βάση ενός genome wide miRNA expression profiling) φάνηκε ότι τέσσερα miRNAs (miR-18b, miR-103, miR-107 και miR-652) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να προβλεφθεί υποτροπή της νόσου και συνολικά η επιβίωση των πασχόντων (354).

Αρκετές μελέτες μέχρι σήμερα έχουν διερευνήσει την εν δυνάμει συσχέτιση μεταξύ κυκλοφορούντων miRNAs και μεταστατικών εστιών από πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού και την πιθανή χρήση τους στη διάγνωση της γενικευμένης μεταστατικής νόσου. Βάσει της παρατήρησης ότι το miR-10b και miR-373 υπερεκφράζονται στα καρκινικά στοιχεία μεταστατικών εστιών, από καρκίνο του μαστού, σε λεμφαδένες, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα των κυκλοφορούντων των ανωτέρω μορίων στους ορούς ασθενών για την εν δυνάμει χρησιμοποίησή τους ως βιοδείκτες όσον αφορά τη διάγνωση διήθησης λεμφαδένων από (μεταστατικά) καρκινικά κύτταρα του μαστού. Τα επίπεδα των miR-10b και miR-373 ήταν υψηλότερα σαφώς σε προεγχειρητικούς ασθενείς με μεταστατική νόσο (λεμφαδένες)



καρκίνου του μαστού συγκριτικά με πάσχοντες χωρίς μεταστατικές εστίες και με υγιείς (control) (355).

Επίσης, σε άλλη μελέτη μετρήθηκαν τα επίπεδα τεσσάρων miRNAs σχετιζόμενων με τον καρκίνο του μαστού (miR-10b, miR-34a, miR-141 και miR-155) τόσο σε ασθενείς με πρωτοπαθή νόσο, όσο και σε πάσχοντες με μεταστάσεις και υγιείς (control) με qRT-PCR. Η αυξημένη έκφραση του miR-34a στην κυκλοφορία συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου-όγκου, ενώ οι αυξημένες συγκεντρώσεις των miR-10b, miR-34a και miR-155 συσχετίστηκαν με την παρουσία μεταστατικών εστιών (356). Στη μελέτη δε των Shaker και συν. (357), αξιολογήθηκε η έκφραση τεσσάρων miRNAs στον ορό αίματος τόσο ασθενών (θήλεα άτομα) με καρκίνο του μαστού όσο και σε υγιή άτομα (control group). Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση των επιπέδων των miR-155, miR-197, miR-205 και miR-29b-2 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, ενώ τα επίπεδα των ανωτέρω μορίων συσχετίστηκαν με το στάδιο της νόσου (T3 έναντι T2) και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (N3 έναντι N2). Επιπλέον, τα επίπεδα-έκφραση των miR-155 και miR-205 μόνο συσχετίστηκαν για την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων.

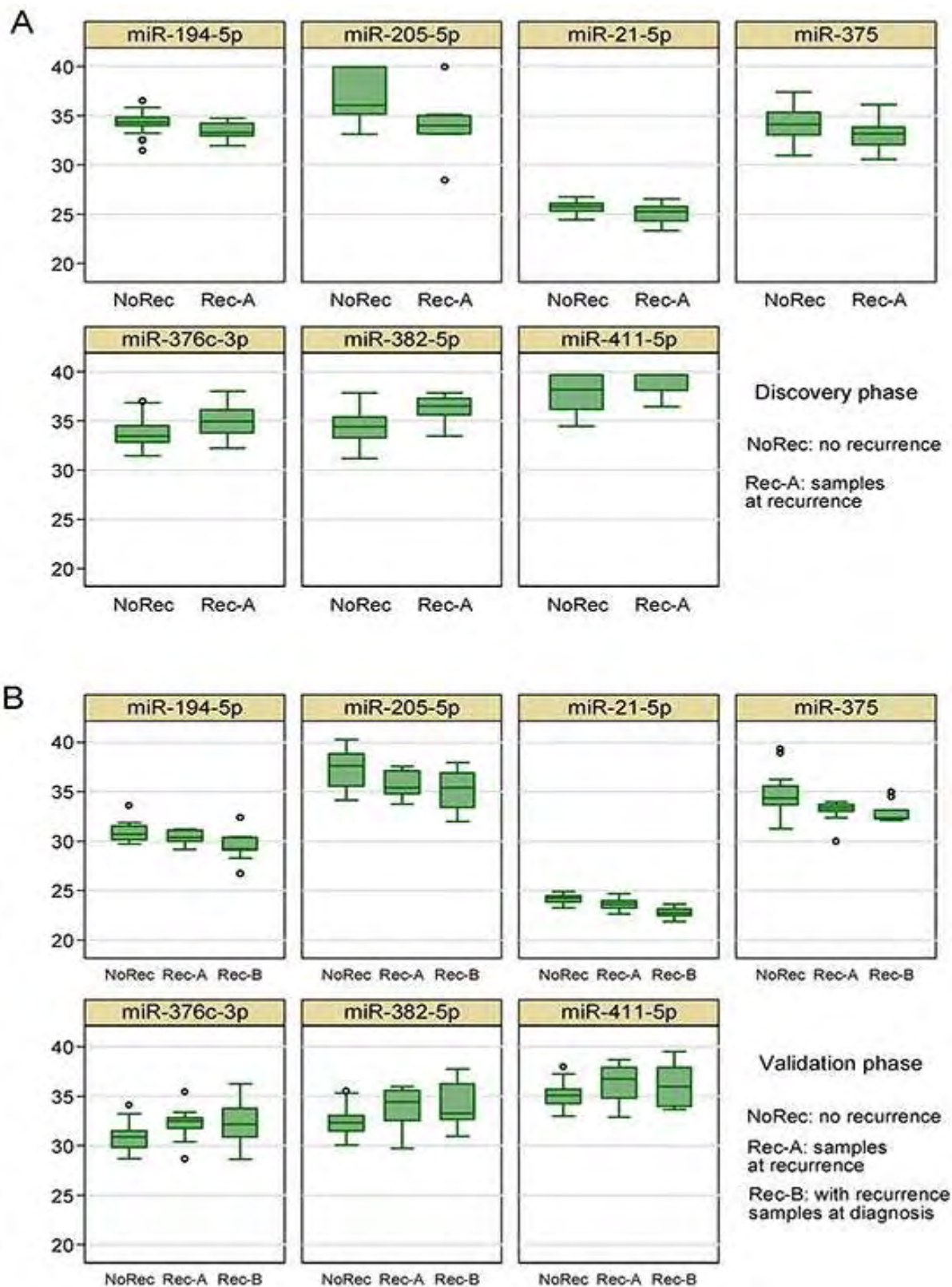
Έρευνα για την έκφραση miRNAs (miRNAs expression profiling) σε δείγματα ορού και ιστού από ασθενείς με πρώιμου σταδίου καρκίνο του μαστού και από υγιή άτομα (control) αποκάλυψε μείωση των επιπέδων του miR-92a, ενώ η έκφραση του miR-21 παρουσίασε αύξηση τόσο σε επίπεδο δείγματος ιστού και ορού των ασθενών με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου συγκριτικά με το υγιές-control group. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα στον ορό αίματος των miR-92a και miR-21 συσχετίστηκαν με το μέγεθος του όγκου και την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (358). Επιπλέον, κατόπιν διερεύνησης σε τρεις ομάδες (ασθενείς με υποτροπή της νόσου, ασθενείς χωρίς υποτροπή της νόσου και υγιή άτομα -control group-) ταυτοποιήθηκαν είκοσι δύο miRNAs, αποτελέσματα που ακολούθως επιβεβαιώθηκαν από μη μελέτη ορών αίματος προερχομένων από μία ανεξάρτητη κοόρτη υποτροπιαζόντων και μη υποτροπιαζόντων ασθενών με καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, η αυξημένη έκφραση των miR-21-5p, miR-375, miR-205-5p και miR-194-5p και η μειωμένη έκφραση των miR-382-5p, miR-376c-3p και miR-411-5p συνδέθηκαν με την εμφάνιση υποτροπής στον καρκίνο του μαστού (359) (Εικόνα 17-18) (Πίνακας 4).

**Matrix of correlation coefficients among the 7 validated miRNAs**

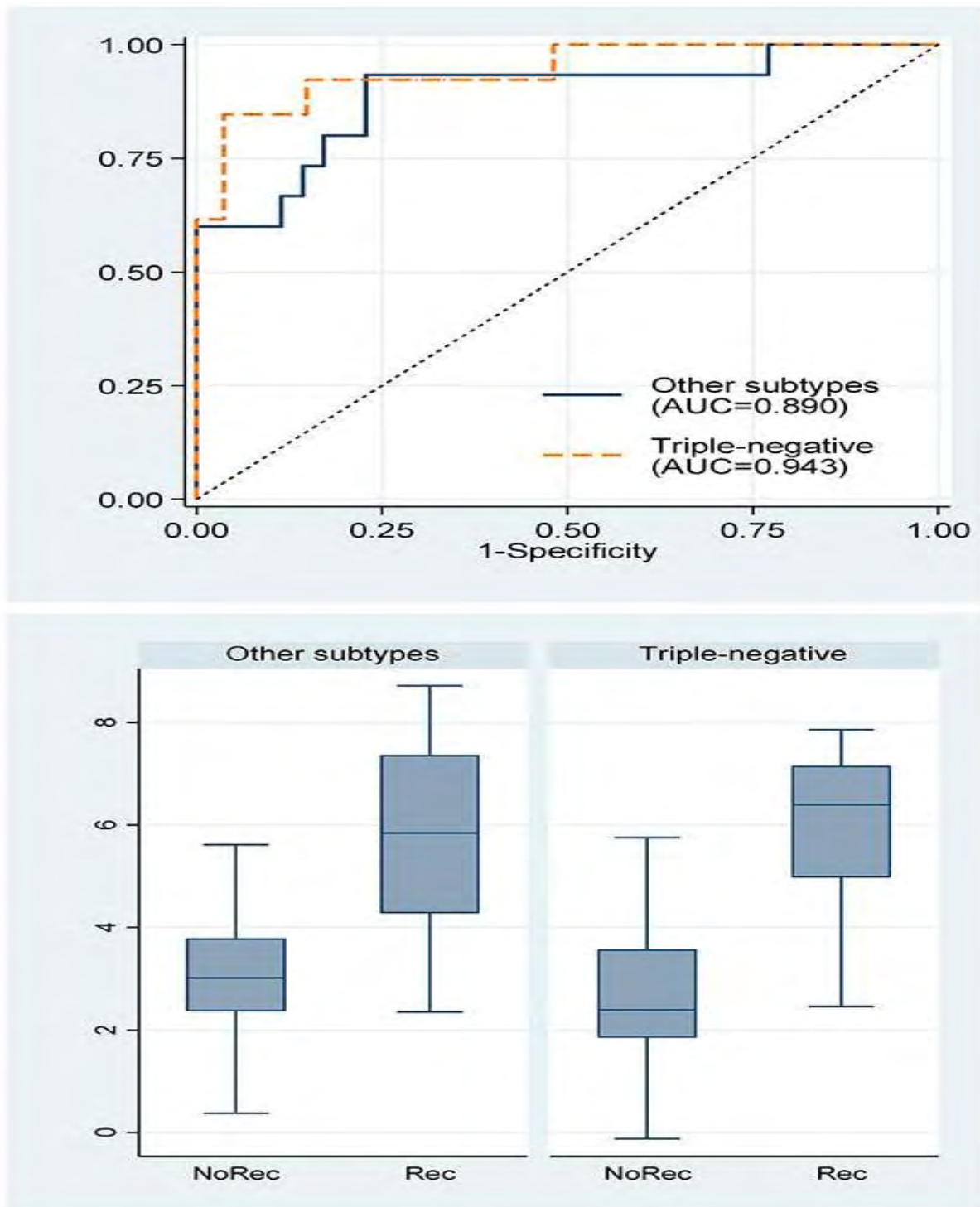
	miR-194-5p	miR-205-5p	miR-21-5p	miR-375	miR-376c-3p	miR-382-5p
miR-194-5p	1					
miR-205-5p	0.34 <sup>*</sup>	1				
miR-21-5p	0.08	0.29 <sup>*</sup>	1			
miR-375	0.32 <sup>*</sup>	0.50 <sup>*</sup>	0.32 <sup>*</sup>	1		
miR-376c-3p	-0.41 <sup>*</sup>	-0.34 <sup>*</sup>	-0.14	-0.33 <sup>*</sup>	1	
miR-382-5p	-0.49 <sup>*</sup>	-0.28	-0.10	-0.30 <sup>*</sup>	0.72 <sup>*</sup>	1
miR-411-5p	-0.52 <sup>*</sup>	-0.09	-0.00	-0.27	0.51 <sup>*</sup>	0.44 <sup>*</sup>

\* p<0.05

Πίνακας 4: Τιμές συσχέτισης για τα επτά επιβεβαιωμένα miRNAs ([Oncotarget](#). 2016 Aug 23; 7(34): 55231–55248.).



Εικόνα 17: Τα υπό διερεύνηση miRNAs που συνδέονται με υποτροπή του όγκου - καρκίνου του μαστού (A: φάση διερεύνησης , B: φάση επιβεβαίωσης) ([Oncotarget](#), 2016 Aug 23; 7(34): 55231–55248.).



Εικόνα 18:Box-plots των επτά miRNAs - σήμα κατατεθέν σε διαφορετικούς υποτύπους του καρκίνου του μαστού (Rec: υποτροπή NoRec: μη υποτροπή του όγκου) ([Oncotarget](#). 2016 Aug 23; 7(34): 55231–55248.).

Σε άλλη μελέτη υπολογίστηκε η έκφραση έξι κυκλοφορούντων (exosomal) miRNAs (των miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 και miR-373) σε δείγματα ορών αίματος από ασθενείς με M0 νόσο (πρωτοπαθής εστία-μη μεταστατική νόσος), σε ασθενείς με M1

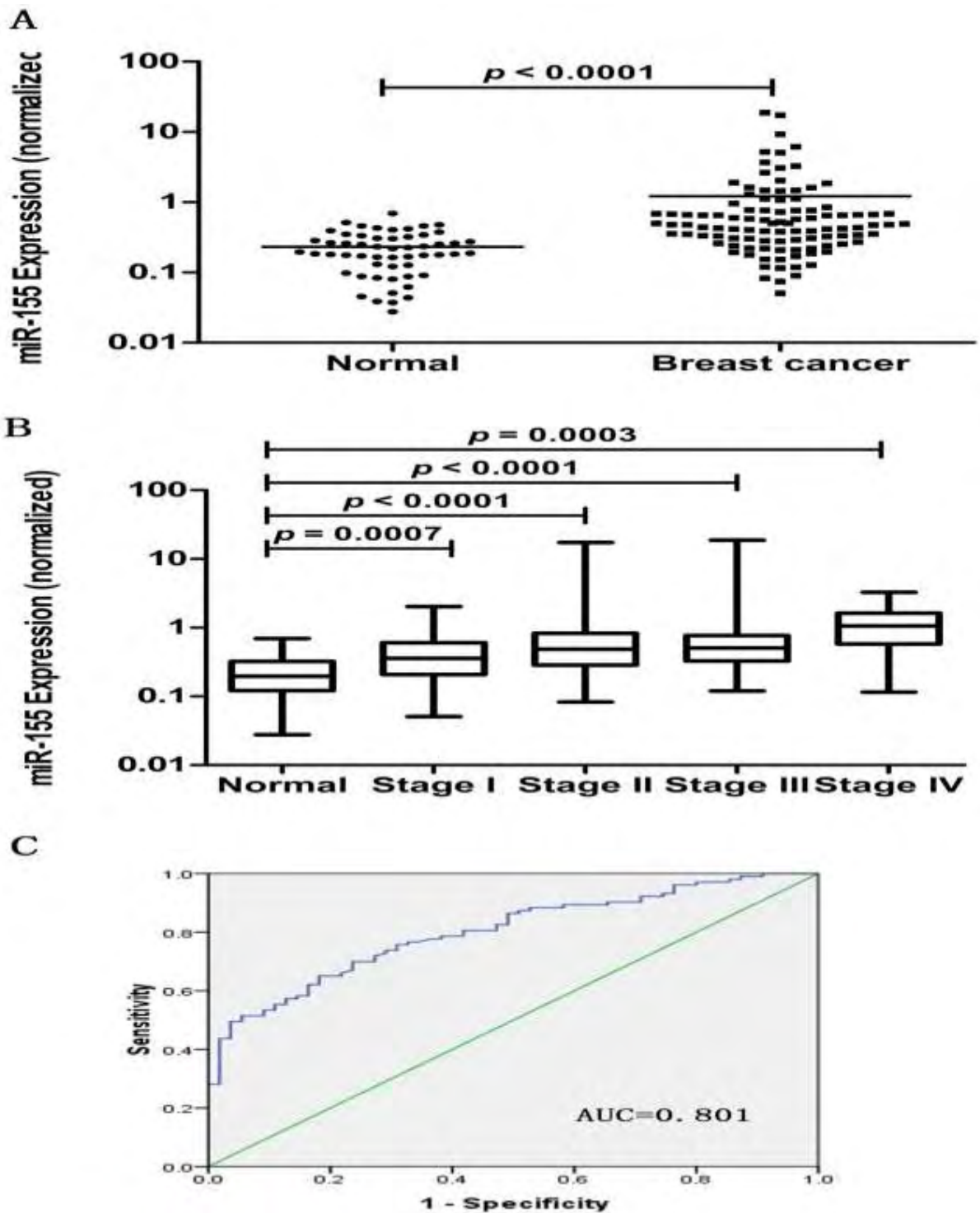
(μεταστατική νόσος) και σε υγιή άτομα (control). Παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφορά στην έκφραση των κυκλοφορούντων miR-34a, miR-93 και miR-373 μεταξύ M0 ασθενών και υγιών ατόμων, ενώ τα επίπεδα των miR-17 και miR-155 ήταν σαφώς υψηλότερα στους M0 από ότι στους M1 ασθενείς συγκριτικά. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα του miR-373 συσχετίστηκαν με αρνητικότητα του HER2 υποδοχέα όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα της πρωτοπαθούς εστίας, ενώ τα επίπεδα των miR-17 & miR-34a συσχετίστηκαν με την έκφραση των ER και PR (οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων) (360).

#### **4.5 Τα κυκλοφορούντα miRNAs ως (predictive) προβλεπτικοί βιοδείκτες**

Ελάχιστες μόνο μελέτες έχουν διερευνήσει την αξία των κυκλοφορούντων μορίων miRNAs στον καρκίνο του μαστού ως προβλεπτικών βιοδεικτών στα πλαίσια της αξιολόγησης της ανταπόκρισης που παρουσίασαν οι ασθενείς στη χορηγηθείσα σε αυτούς θεραπεία. Σε μία εξ'αυτών των μελετών, υπολογίστηκε το επίπεδο έκφρασης τεσσάρων miRNAs σχετιζομένων με τον καρκίνο του μαστού στον ορό αίματος από τρεις ομάδες ατόμων α) ασθενείς με διηθητικού καρκίνου των πόρων του μαστού, β) ασθενείς που έχουν λάβει προεγχειρητικά επικουρική χημειοθεραπεία και γ) υγιή άτομα (control). Μεταξύ των υπό μελέτη miRNAs, μόνο το miR-125b παρουσίασε την υψηλότερη έκφραση επί των μη ανταποκρινόμενων στη θεραπεία καρκινοπαθών γεγονός που πιθανότατα αποδεικνύει την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης του miR-125b και της ανάπτυξης αντίστασης έναντι της χημειοθεραπείας από τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού (361).

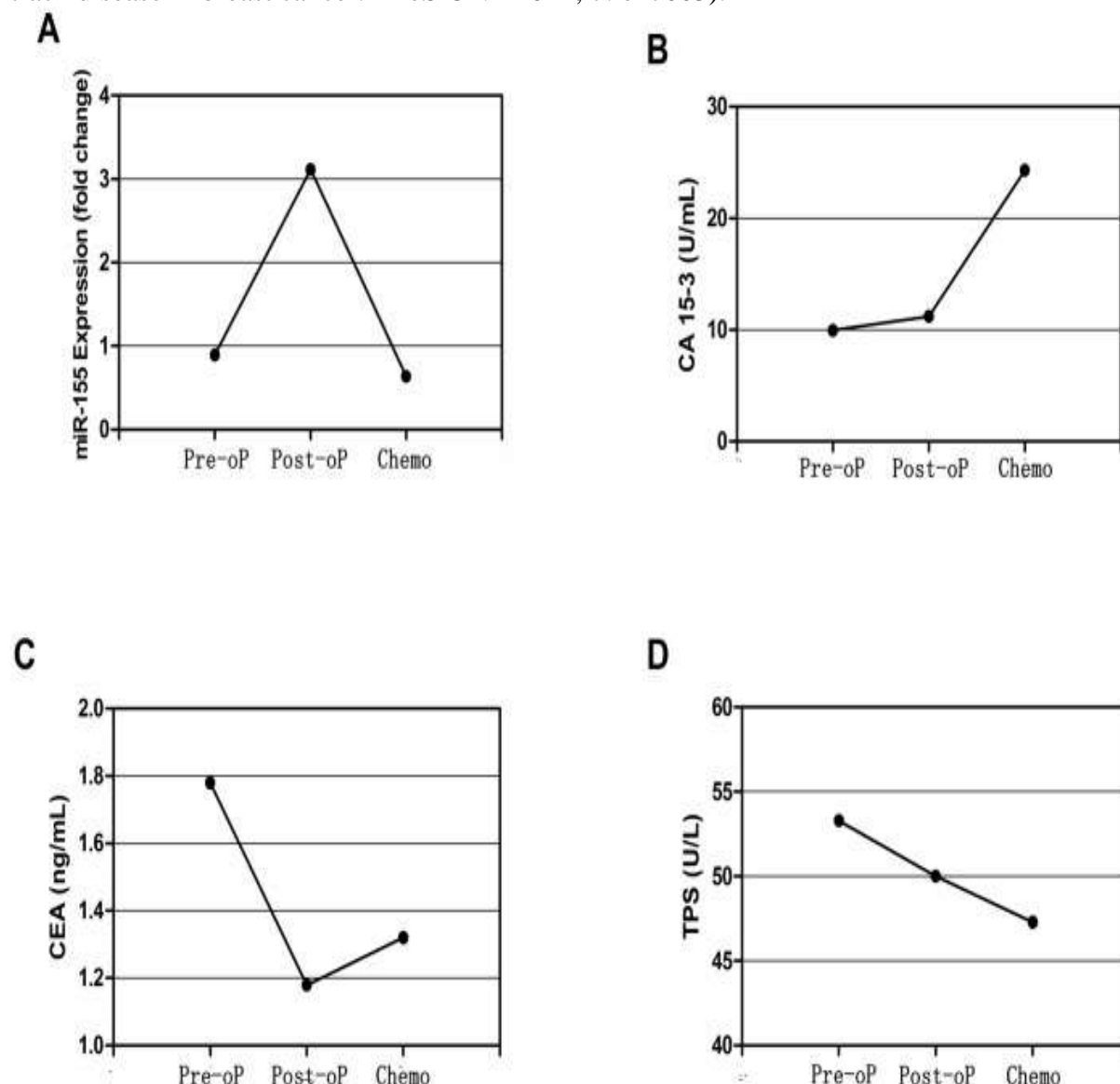
Στη μελέτη των Wu και συν. (339), μελετήθηκαν τα κυκλοφορούντα μόρια (μέσω deep sequencing τεχνικής) miRNAs από ορούς αίματος μίας κοόρτης ασθενών, σταδίου II και III, οι οποίοι είχαν λάβει επικουρική χημειοθεραπεία, που ακολούθησε χειρουργική εκτομή του όγκου. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-375 και τα αντίστοιχα αυξημένα του miR-122 ήταν σαφώς διακριτά μεταξύ των ασθενών με ή χωρίς υποτροπή της νόσου, ενώ τα αυξημένα επίπεδα των miR-375, miR-184, miR-1299 και miR-196a και τα αντίστοιχα μειωμένα επίπεδα των miR-381, miR-410 και miR-1246 παρατηρήθηκαν σε ασθενείς καλά ανταποκρινόμενους στη χορηγηθείσα σε αυτούς χημειοθεραπεία. Τα αποτελέσματα για το miR-122 επιβεβαιώθηκαν ακολούθως από τη μελέτη μίας δεύτερης κοόρτης ασθενών από καρκίνο του μαστού, σταδίου II-III, όπου επίσης φάνηκε αξιοσημείωτη σχέση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης του miR-122 και του κινδύνου υποτροπής. Το γεγονός αυτό δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για τη χρησιμοποίηση μελλοντικά των miR-122 & miR-375 στην πρόβλεψη του βαθμού ανταπόκρισης των ασθενών στην χορηγηθείσα χημειοθεραπεία και του κινδύνου υποτροπής της νόσου.

Τέλος, στη μελέτη των Sun και συν. (362), μελετήθηκε η έκφραση του miR-155 σε ορούς ασθενών με καρκίνο του μαστού και υγιή άτομα, κάνοντας χρήση qRT-PCR. Αυξημένα επίπεδα του miR-155 παρατηρήθηκαν μεταξύ των καρκινοπαθών του δείγματος. Μάλιστα, σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εκτομή και έλαβαν κατόπιν χημειοθεραπεία (τέσσερις κύκλους), τα επίπεδα στην κυκλοφορία του miR-155 παρουσίασαν σημαντική μείωση, υποδεικνύοντας το miR-155 ως εν δυνάμει βιοδείκτη για την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία (Εικόνα 19-20).





Εικόνα 19: (Α) Επίπεδα έκφρασης του miR-155 σε υγιή άτομα και πάσχοντες από καρκίνο του μαστού (Β) Επίπεδα έκφρασης του miR-155 σε υγιή άτομα και σε πάσχοντες (διαφορετικού σταδίου) από καρκίνο του μαστού (C) (95% CI: 0.734 to 0.868) (Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. PLoS ONE 2012; 7: e47003).



Εικόνα 20: Μεταβολές των συγκεντρώσεων των miR-155, CA 15-3, CEA, και TPS στον ορό αίματος ασθενών (Pre-oP:προεγχειρητικά Post-oP:μετεγχειρητικά Chemo:κατόπιν χημειοθεραπείας) (Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. PLoS ONE 2012; 7: e47003).

#### 4.6 Περιορισμοί στη χρήση των miRNAs ως βιοδεικτών στον καρκίνο του μαστού

Η καθιέρωση ενός ακριβούς και αξιόπιστου πάνελ κυκλοφορούντων miRNAs, όσον αφορά την πρόγνωση, τη διάγνωση και τη δυνατότητα πρόβλεψης της πορείας νόσου-ανταπόκρισης στη χορηγηθείσα θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού, αποτελεί αναμφισβήτητη πρόκληση σε κάθε βήμα που μεσολαβεί από τη συλλογή του δείγματος έως την ανάλυση δεδομένων και

επεξεργασία (363). Σημαντικός περιορισμός στη χρήση των miRNAs ως βιοδεικτών είναι οι χαμηλές συγκεντρώσεις τους, γεγονός που παρεμποδίζει την ανίχνευση τους με τη χρήση τεχνικών όπως οι μικροσυστοιχίες. Ως λύση στο ανωτέρω πρόβλημα αποτελεί μία νέα μέθοδος που βασίζεται στην καταρχήν απομόνωση και μετά στον εμπλουτισμό των miRNA πριν την έναρξη οποιασδήποτε άλλης επεξεργασίας (284).

Άλλο σημαντικό πρόβλημα είναι η επιλογή του προς επεξεργασία δείγματος. Η πλειονότητα των δημοσιευμένων μελετών χρησιμοποιούν ορό αίματος ή πλάσμα. Έχει αποδειχτεί ότι ο ορός είναι η καλύτερη δυνατή επιλογή καθώς έτσι αποφεύγουμε τον αποκλεισμό ενός δείγματος εξαιτίας της παρουσίας αιμόλυσης. Επιπλέον, τα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs είναι υψηλότερα στον ορό από ότι στο πλάσμα, γεγονός που πιθανώς δείχνει την εν δυνάμει παρεμβολή των λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων κατά την προετοιμασία του δείγματος (364). Είναι επομένως σημαντικό να χρησιμοποιείτε ο ίδιος τύπος δείγματος (τόσο για ασθενείς όσο και για υγιή άτομα), να αποφεύγονται δείγματα με σημεία αιμόλυσης και να χρησιμοποιείται ένα προτυποποιημένο πρωτόκολλο συλλογής δείγματος και επεξεργασίας αυτού.

Η επιλογή των ασθενών και η ταξινόμηση αυτών είναι ένα κρίσιμο ζήτημα για τις κλινικές μελέτες. Ικανός αριθμός ερευνών έχουν αναφέρει ότι παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις στα επίπεδα των κυκλοφορούντων μορίων miRNAs σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη χημειοθεραπεία (365-367). Για να αντιμετωπιστεί το εν λόγω πρόβλημα, θα πρέπει να λαμβάνετε σοβαρά υπόψη το θεραπευτικό σχήμα των ασθενών ή διαφορετικά τα δείγματα αίματος θα πρέπει να συλλέγονται προ της χημειοθεραπείας.

Σημαντικός παράγοντας, επίσης, είναι η επιλογή της πλατφόρμας με την οποία θα υπολογιστούν τα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs. Είναι φανερό ότι οι πλειονότητα των μελετών βασίζονται για το άσκοπο αυτό στη χρήση qRT-PCR. Παρόλο που η μέθοδος αυτή παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και είναι λιγότερη δαπανηρή, βασικός περιορισμός της μεθόδου είναι η αδυναμία ανακάλυψης καινοφανών miRNAs (όλες οι προηγούμενες μελέτες σε προϋπάρχοντα πάνελ miRNAs όπως είχαν προηγουμένως απομονωθεί σε ιστούς). Τέλος, υπάρχει έλλειψη αξιόπιστων κυκλοφορούντων housekeeping - miRNAs για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης. Εξαιτίας αυτού, για να γίνει κανονικοποίηση (normalization), γίνεται χρήση ίσων ποσοτήτων ενός αρχικού υλικού (ορού ή πλάσματος) (284), ή ενός spike-in-control, το οποίο και βρέθηκε να είναι περισσότερο αξιόπιστο συγκριτικά με τα ενδογενή miRNAs για κανονικοποίηση δεδομένων (368).

Όπως παρατηρήθηκε στην ανωτέρω αξιολόγηση των δημοσιευθέντων, υπάρχει μία ελάχιστη αλληλοεπικάλυψη στα εξετασθέντα πάνελ των miRNAs μεταξύ των διαφορετικών μελετών, η οποία αλληλοεπικάλυψη αντανακλά τη σύνθετη βιολογία της έκφρασης των miRNAs στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Με τον όρο καρκίνος του μαστού, αναφερόμαστε σε μία

ετερογενή ομάδα νοσημάτων (διαφορετικοί ιστολογικοί και μοριακοί υπότυποι της νόσου) με μεγάλη ποικιλία βιολογικών συμπεριφορών. Οι αποκλίσεις που αναφέρθηκαν από τις διάφορες ομάδες μελετητών στα εξετασθέντα miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών, μπορεί να οφείλεται στην ετερογένεια της νόσου και στην κλινική της εικόνα. Η ύπαρξη αυτής της ποικιλομορφίας μπορεί να οφείλεται στη συμβολή και άλλων ιστών εκτός του καρκινικού (του μαστού) στα μετρήσιμα επίπεδα των κυκλοφορούντων επιπέδων miRNAs. Τα κυκλοφορούντα εξοσώματα και μικροκυστίδια (microvesicles) είναι φορείς miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος και η βιολογική συμπεριφορά τους και το περιεχόμενό τους εξαρτάται από το κύτταρο προέλευσης τους (369). Μία πιθανή δυνατή λύση είναι ο εμπλουτισμός ογκο-ειδικών miRNAs μέσω απομόνωσης κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων κάνοντας χρήση δεικτών ειδικών για τον ιστό προέλευσης (π.χ. η απομόνωση από τα κύτταρα του καρκίνου των ωοθηκών του μορίου κυτταρικής επιθηλιακής συγκόλλησης EpCAM-θετικών μικροκυστιδίων) (370).

Στον (Πίνακα 5) που ακολουθεί στην επόμενη σελίδα παρουσιάζεται μία σύνοψη όσον κατεγράφησαν στο review των (Hamma et al) (Citation: Cell Death and Disease (2017) 8, e3045; doi:10.1038/cddis.2017.440 - Official journal of the Cell Death Differentiation Association).

Source	No.	MIRNA	Expression level	Diagnostic	Prognostic	Predictive	Validated	Platform
Blood	83	MIR-195, let-7 and -155	Higher in BC patients	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Serum	168	MIR-214	Discriminates malignant from benign tumors and healthy subjects	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Plasma	247	MIR-127-3p, -376a, -148b, -409-3p, -652 and -801	Higher in BC patients	Yes	No	No	Yes	qRT-PCR
Plasma	137	MIR-148b, -133a, and -409-3p	Higher in BC patients	Yes	No	No	Yes	qRT-PCR
Serum	100	MIR-15a	Higher in BC patients	Yes	No	No	Yes	qRT-PCR
		MIR-18a, -107, -425, -133a, -139-5p, -143, -145, and -665	Lower in BC patients	Yes	No	No	Yes	qRT-PCR
Serum	137	MIR-484	Higher in BC patients	Yes	No	No	Yes	qRT-PCR
Serum	1280	MIR-124b, -1307-3p, and -6861-5p	Higher in BC patients	Yes	No	No	Yes	Microarray; qRT-PCR
Serum	63	MIR-4634 and -6875-5p	Lower in BC patients	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Serum	164	MIR-155, -19a, -181b, and -24	Higher in BC patients	Yes	No	No	Yes	Microarray; qRT-PCR
		MIR-1, -82a, -133a, and -133b	Higher in BC patients	Yes	No	No	Yes	qRT-PCR
Plasma	197	MIR-505-5p, -125b-5p, -21-5p, and -96-5p	Higher in BC patients	Yes	No	No	Yes	qRT-PCR
Serum	90	let-7c	Lower in BC patients	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Serum	46	MIR-182	Higher in BC patients	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Blood	83	MIR-138	Higher in BC patients	Yes	No	No	No	Microarray; qRT-PCR
Serum	13	MIR-155	Correlates with PR status	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Serum	68	MIR-21, -126, -155, -198a, and -335	Associated with histological tumor grade and ser hormone receptor expression	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Serum; Plasma	46	MIR-4270, -1225-5p, -188-5p, -1202, -4281, -1207-5p, -642b-3p, -1290, and -3141	Higher in BC patients and correlates with stage and molecular subtype	Yes	No	No	Yes	Microarray; qRT-PCR
Serum	102	MIR-202 and let-7b	Higher expression in BC patients and correlates with tumor aggressive and overall survival	Yes	Yes	No	No	qRT-PCR
Serum	87	MIR-148b-3p and -652-3p	Lower in the BC patients	Yes	Yes	No	Yes	qRT-PCR
Serum	130	MIR-10b-5p	Higher levels correlate with poor prognosis	Yes	Yes	No	Yes	qRT-PCR
		MIR-18b, -103, -107, and -852	Associated with tumor relapse and overall survival in TNBC patients	Yes	Yes	No	Yes	qRT-PCR
Plasma	60	MIR-10b and -373	Higher in breast cancer patients with LN metastasis	Yes	Yes	No	Yes	qRT-PCR
Serum	89	MIR-10b, 34a, and -155	Correlates with tumor stage and/or metastasis	Yes	Yes	No	No	qRT-PCR
Serum	100	miR-29b-2, miR-155, miR-197 and miR-205	Correlates with tumor grade and metastasis	Yes	Yes	No	No	qRT-PCR
Serum	100	MIR-92a	Lower in BC patients, LN metastasis	Yes	Yes	No	No	qRT-PCR
Serum	90	MIR-21	Higher in BC patients, LN metastasis	Yes	Yes	No	Yes	qRT-PCR
Serum	152	MIR-21-5p, -375, -205-5p, and -194-5p	Higher in recurrent BC patients	Yes	No	No	No	qRT-PCR
		MIR-382-5p, -376-3p, and -411-3p	Lower in recurrent BC patients	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Serum	56	miR-125b	Expression correlated with metastasis and HER2, PR, and ER status	Yes	No	No	No	qRT-PCR
Serum	68	MIR-122	Higher expression in non-responsive patients	Yes	No	Yes	No	qRT-PCR
Serum	100	MIR-375	Lower in NR and pCR	No	No	Yes	Yes	qRT-PCR
		MIR-155	Higher in BC patients; decreased level after chemotherapy	Yes	No	Yes	No	qRT-PCR

Πίνακας 5:

## **5 - Ανίχνευση κυκλοφορούντων exo-miRNAs (exosomal-miRNAs) διαγνωστική και θεραπευτική χρήση τους**

Οι καρκινοπαθείς έχουν μεγαλύτερο αριθμό κυκλοφορούντων εξωσωμάτων (exosomes) σε σύγκριση με τα υγιή άτομα (control) (160). Τούτο υπονοεί ότι τα κυκλοφορούντα exo-miRNAs στους καρκινοπαθείς κατά τρόπο δυσανάλογο αντιπροσωπεύουν τα προερχόμενα από τα καρκινικά κύτταρα ή από τα λοιπά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (TME-tumor microenvironment) και όχι τα προερχόμενα από τα φυσιολογικά κύτταρα μη εμπλεκόμενα στην καρκινογένεση. Συνεπώς, η ανίχνευση των exo-miRNAs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς στον καρκίνο του μαστού. (έχουμε αναφερθεί αναλυτικότερα σε προηγούμενο κεφάλαιο γενικά για τη χρήση των miRNAs ως βιοδείκτες )(162).

### **5.1 Κυκλοφορούντα exo-miRNAs σε ορό και πλάσμα για πρόωμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού**

Ένα αξιόπιστο αιματολογικό τεστ το οποίο συμπληρώνει την ευαισθησία και ειδικότητα της μαστογραφίας -στα πλαίσια προληπτικού ελέγχου του πληθυσμού - θα ήταν σίγουρα ένα ιδανικό εργαλείο για την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την ανίχνευση κυκλοφορούντων miRNAs στον ορό και στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση πάντα με υγιή άτομα (controlgroup). Δυστυχώς υπάρχει σχετικά περιορισμένη αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των miRNAs-signatures (163). Τα exo-miRNAs θεωρούνται ότι είναι η επικρατέστερη πηγή miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος, τα οποία απομονώνονται είτε στο πλάσμα είτε στον ορό (165). Κατά μία άποψη, η ανίχνευση miRNAs ,στο απομονωθέν από τον ορό ή το πλάσμα, κλάσμα εξωσωμάτων μπορεί να μας παρέχει μία υψηλότερης ποιότητας και συνεπέστερη “ανάγνωση” από ότι μία “αδρή” εξέταση δειγμάτων ορού ή πλάσματος (164-166). Στην παρούσα φάση, υπάρχουν λίγες μόνο μελέτες που έχουν αναλύσει τα κυκλοφορούντα exo-miRNAs από ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Σε μία μελέτη (169) που συμμετείχαν 50 καρκινοπαθείς με καρκίνο του μαστού και 28 υγιή άτομα (controls), τα επίπεδα του miR-101 & miR-372 ήταν σημαντικά υψηλότερα στις περιπτώσεις καρκινοπαθών όταν ανιχνεύονταν τα miRNAs σε RNA από εξωσώματα, αλλά όχι σε RNA ορού (169). Αντιστρόφως, τα επίπεδα του miR-373 ήταν υψηλότερα στους

καρκινοπαθείς όταν η ανίχνευση του γινόταν στον ορό, αλλά όχι σε προπαρασκευές εξοσωμάτων (exosomepreparations) (169).

Περίεργως, η ανάλυση υποομάδων, που βασίζεται στην κατάσταση (status) των οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών υποδοχέων (PR), έδειξε ότι τα επίπεδα του exo-miRNAs-373 ήταν σαφώς υψηλότερα σε περιπτώσεις ασθενών με αρνητικούς υποδοχείς, αποτέλεσμα σύμφωνο με τα αντίστοιχα υψηλά επίπεδα του miR-373 σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (triple negative breast cancer - ER[-], PR[-], HER2[-] [TNBC]) (169). Η διαφοροποιημένη έκφραση των exo-miRNAs, η οποία βασίζεται στον υπότυπο του όγκου, μπορεί να φανεί χρήσιμη στην ταυτοποίηση των πλέον επιθετικών υποτύπων. Να σημειωθεί ότι η ανάλυση ορού για τα τρία miRNAs (miR-373, miR101, miR-372) δεν διαχώριζε καλοήγη νοσήματα του μαστικού αδένα από τον καρκίνο του μαστού, ενώ δεν γίνεται στη μελέτη καμία αναφορά για ανάλυση εξοσωμάτων για τα ανωτέρω αναφερθέντα miRNAs για τον διαχωρισμό καλοήθων και κακοήθων εξεργασιών του μαστού.

Σε έτερη μελέτη (170), τα exo-miR-21 και exo-miR-1246 ανιχνεύονταν σταθερά σε υψηλά επίπεδα στο πλάσμα ποντικών (στα οποία είχε μεταμοσχευτεί ένας σταθερά αναπτυσσόμενος όγκος προερχόμενος από άνθρωπο-ασθενή) ή στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, σε αντιδιαστολή πάντα με τα υγιή άτομα του control group. Τα ευρήματα αυτά έρχονται να επιβεβαιώσουν τα αντίστοιχα υψηλά επίπεδα των ανωτέρω miRNAs σε ορό ή πλάσμα (171-173). Η ανάλυση των exo-miRNAs προερχόμενων από καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών (που αφορούν καρκινώματα του μαστού) και απαθανατισμένων επιθηλιακών κυττάρων του μαστικού αδένα δείχνει μία διαφοροποιημένη φόρτωση (loading) μερικών miRNAs σε εξοσώματα καθώς και υποστηρίζει τη σκέψη ότι τα επίπεδα των μορίων αυτών στην κυκλοφορία μπορεί να είναι υψηλότερα σε σχέση με τα κύτταρα προέλευσης τους (166,167,174,175).

Αυτού του τύπου exo-miRNAs μπορούν να αποτελέσουν καλούς υποψηφίους για χρήση ως βιοδείκτες στα πλαίσια διάγνωσης της νόσου στα πρώιμα στάδια αυτής. Πραγματικά, το miR-1246 ήταν μεταξύ των κορυφαίων miRNAs, εκκρίνονταν σε εξοσώματα, προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF7, Sk-BR-3, MDA-MB-231) ή σχετιζόνταν με απαθανατισμένες κυτταρικές σειρές (MCF10A, IRM90) (166). Τα επίπεδα του exo-miR-182 ήταν αξιοσημείωτα υψηλότερα από τα αντίστοιχα των exo-miR-96 και exo-miR-183, αλλά αυτά τα miRNAs εκφράζονταν σε ίδια περίπου επίπεδα στις σειρές καρκινικών κυττάρων του μαστού - (MCF7, BT474, MDA-MB-231) (175). Ένας προβληματισμός με τις μελέτες όπου γίνεται χρήση κυτταρικών καλλιεργειών είναι ότι ο εμβρυϊκός ορός βοός (FBS), ο οποίος και χρησιμοποιείται στην προπαρασκευή των περισσότερων θρεπτικών μέσων μπορεί να περιέχει exo-miRNAs ή ελευθέρως-κυκλοφορούντα miRNAs, ταυτόσημα στην αλληλούχιση τους με τα ανθρώπινα miRNAs γεγονός που μπορεί να προκαλέσει σύγχυση κατά την ερμηνεία των



αποτελεσμάτων (176). Τα miR-122, miR-451 και το miR-1246 βρίσκονται εν αφθονία στο FBS και ο πιθανός αναφερόμενος εμπλουτισμός αυτών των miRNAs σε εξοσώματα μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να ερμηνευτεί ότι αποτελεί βόειας προέλευσης (176).

## **5.2 Τα κυκλοφορούντα exo-miRNAs για την παρακολούθηση του βαθμού ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία τους**

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες στις οποίες αναλύθηκαν τα επίπεδα κυκλοφορούντων miRNAs σε ορό ή πλάσμα πριν ή μετά τη χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας. Διαφορές που παρατηρούνται στα χορηγούμενα φαρμακευτικά σκευάσματα και στους υπότυπους του όγκου σε αυτές τις μελέτες έχουν καθυστερήσει έως και παρεμποδίσει την ταυτοποίηση ενός miRNA σαν ένα δυνατό σήμα κατατεθέν (signature) (163). Στην παρούσα φάση υπάρχουν από καμία έως ελάχιστες βιβλιογραφικά αναφορές οι οποίες επικεντρώνονται στη χρήση των miRNAs (βασιζόμενοι στην επεξεργασία δειγμάτων αίματος) για την παρακολούθηση ή ακόμη και πρόβλεψη της ανταπόκρισης ενός ασθενούς με καρκίνο του μαστού στη θεραπεία την οποία λαμβάνει. Το exo-miR-503 προερχόμενο από ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να μεταφερθεί σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού *in vitro*, κατά αυτόν τον τρόπο τροποποιείται ο διηθητικός φαινότυπος και ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού του όγκου (177). Τα επίπεδα του κυκλοφορούντος μορίου miR-503 παρατηρήθηκαν αυξημένα σε ασθενείς που λάμβαναν επικουρική ή μη χημειοθεραπεία. Τα αποτελέσματα αυτά τουλάχιστον υπονοούν κάποια συμβολή από το ενδοθηλιακής προέλευσης exo-miR-503, ωστόσο οι μελετητές δεν εξέτασαν άμεσα την ανωτέρω υπόθεση (177).

## **5.3 Περιορισμοί, προκλήσεις και ευκαιρίες για διαγνωστικού τύπου κλινικές εφαρμογές**

Υπάρχει μικρός ακόμη αριθμός μελετών που επικεντρώνονται ειδικά στην ανίχνευση exo-miRNAs στον καρκίνο του μαστού. Απαιτούνται ακόμη περισσότερες μελέτες για να αξιολογηθεί η δυναμική και αναπαραγωγικότητα των exo-miRNAs και για να επιβεβαιωθούν με τρόπο ανεξάρτητο τα exo-miRNAs ως μοριακές υπογραφές στον καρκίνο του μαστού. Η εναρμόνιση των υπαρχόντων τεχνικών στον τομέα της απομόνωσης εξοσωμάτων και της ανίχνευσης exo-miRNAs θα ήταν σίγουρα απαραίτητη για να καταστεί δυνατή η απευθείας σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ μελετών. Στη παρούσα φάση, η χρωματογραφία τύπου size-exclusion θεωρείται η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την απομόνωση των πλέον εμπλουτισμένων εξοσωμάτων, ωστόσο τα τρέχοντα πρωτόκολλα ακόμη είναι δύσκολο να εφαρμοστούν για κλινική χρήση (161). Συνολικά μπορεί να χρειαστεί να πραγματοποιηθεί ένας συμβιβασμός-συγκερασμός μεταξύ μίας τεχνικής μεθόδου η οποία θα

επιτρέπει έναν συνεπή εμπλουτισμό εξοσωμάτων με ένα αποδεκτό ποσό άλλων “μολυσματικού τύπου” εξωκυττάρων κυστιδίων και μίας μεθόδου τεχνολογικής η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα κλινικού τύπου εργαστήριο (198).

Η ανίχνευση exo-miRNAs επιπλέον προσφέρει μοναδικές ευκαιρίες ανάλυσης. Οι πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια των εξοσωμάτων ταιριάζει με εκείνες της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων προέλευσης τους. Η επιλογή, που βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων, ειδικού κυτταρικού τύπου πρωτεϊνών επιφανείας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να τον εμπλουτισμό και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών με λιγότερα παράσιτα ενός ειδικού κυτταρικού τύπου σε έναν όγκο. Για παράδειγμα, το μόριο της επιθηλιακής κυτταρικής προσκόλλησης (epithelial cell adhesion molecule -EpCam-) έχει αναφερθεί ότι χρησιμεύει στη “σύλληψη” εξοσωμάτων και κατόπιν ανίχνευση miRNAs όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου (199). Επίσης, αναφέρονται οι απόψεις μελετητών στη βιβλιογραφία για απώλεια του EpCam στα επιθηλιακής προέλευσης καρκινικά κύτταρα εξαιτίας μηδενικής ή έστω πολύ περιορισμένης έκφρασης του ή ακόμη και διαχωρισμού (cleavage) του μορίου του EpCam (200).

Πιθανότατα θα ήταν σημαντικό να ελεγχθεί εάν η ανάλυση exo-miRNA σε EpCam (+) θετικά εξοσώματα ξεπερνά άλλες δοκιμασίες βασιζόμενες στο EpCam για τη πρόωμη διάγνωση και παρακολούθηση της πορείας και εξέλιξης της νόσου (όπως και την παρακολούθηση του αριθμού των κυκλοφορούντων κυττάρων του όγκου). Παρομοίως θα ήταν σημαντικό να ελεγχθεί εάν exo-miRNAs (κατόπιν εμπλουτισμού για εξοσώματα) τα οποία προέρχονται από όγκο-σχετιζόμενους ινοβλάστες ή από άλλους κυτταρικούς τύπους, μπορούν να παράσχουν επιπλέον πληροφορίες στην ανάλυση EpCam-επιλεχθέντων εξοσωμάτων (200).

#### **5.4 Λειτουργίες των exo-miRNAs και οι θεραπευτικές τους εφαρμογές**

Λειτουργικές μελέτες, με χρήση κυτταρικών σειρών από καρκινώματα του μαστού, διακαλλιέργειες (με χρήση δύο διαφορετικών κυτταρικών σειρών), και μοντέλα ζώων-ξενομοσχεύματα έχουν διαφωτίσει τους διαφορετικούς ρόλους που διαδραματίζουν τα miRNAs τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο στους υπόλοιπους κυτταρικούς τύπους που αναγνωρίζονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου (TME-tumor microenvironment). Συγκεκριμένα, πως επηρεάζουν τα miRNAs τις ακόλουθες λειτουργίες: την υποστήριξη ή καταστολή ακόμη της αύξησης του όγκου, την τροποποίηση της αντίστασης που αναπτύσσουν τα κύτταρα (καρκινικά) στη χημειοθεραπεία και στην προπαρασκευή της

ανάπτυξης μεταστατικής εστίας του πρωτοπαθούς όγκου. Η miRNA-μεσολαβούμενη ρύθμιση ενός κυτταρικού τύπου μπορεί εν δυνάμει να επηρεάσει και άλλους κυτταρικούς τύπους του TME μέσω της ρύθμισης των επιπέδων των εκκρινόμενων χημικών συμπλόκων και χημειοκινών (164). Το exo-miR-21, το οποίο απελευθερώνεται από τα καρκινικά κύτταρα, μπορεί να ληφθεί από τα όγκο-σχετιζόμενα μακροφάγα (tumor associated macrophages - TAMs -) εντός του TME (201). Τα TAMs εκφράζουν Toll ομοιάζοντες υποδοχείς τύπου 8 (TLR8), ο οποίος ήταν και ο πρώτος υποδοχέας για miRNA - ένας miRceptor -που αναγνωρίστηκε.

Μέσω της δέσμευσης του με τον υποδοχέα TLR8, το exo-miR-21 ενεργοποιεί τον NK-κΒ και το μονοπάτι σηματοδότησης στα TAMs, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση του miR-155. Τούτο εν συνεχεία απελευθερώνεται ως ένα exo-miRNA και αποστέλλεται πίσω στα καρκινικά κύτταρα, όπου και αυξάνει την αντίσταση στην κισπλατίνη (cisplatin) μέσω απευθείας στόχευσης του TERF1 (202). Ενώ ο μηχανισμός αυτός έχει περιγραφεί με λεπτομέρεια στο νευροβλάστωμα, καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων (συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού) και ανθρώπινων μονοκυττάρων σε ένα Transwell τύπου σύστημα (χωρίς επαφή κυττάρου με κύτταρο) μόνιμα δίνουν αποτελέσματα που δείχνουν αυξημένα επίπεδα του miR-155 και αντίστοιχα μειωμένα επίπεδα του TERF1 στο καρκινικό κύτταρο παραλήπτη.

Τα δεδομένα αυτά υπονοούν ότι ο περιγραφείς μηχανισμός (αποτελεί τον πρώτο αυτού του τύπου που δείχνει την ικανότητα των exo-miRNAs να δεσμευτούν και να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα ενός σηματοδοτικού μονοπατιού) μπορεί να εμπλέκεται στην απόκτηση χημειοθεραπευτικής αντίστασης σε ένα μεγάλο εύρος ανθρώπινων καρκινωμάτων (203), συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού (202). Τα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι αυξημένα επίπεδα επιλεγμένων miRNAs, τα οποία εντοπίζονται σε εξοσώματα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, διεγείρουν το μετασχηματισμό των μη κακοήθων επιθηλιακών κυττάρων του μαστού κατά έναν Dicer - εξαρτώμενο τρόπο (204,205) υπονοούν ότι τα exo-miRNAs εμπλέκονται στη μεταβίβαση χαρακτηριστικών ή λειτουργιών από ένα κύτταρο-δωρητή σε ένα κύτταρο παραλήπτη. (158,159).

### **5.5 Exo-miRNAs προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα και αντίσταση στην όρμονο - θεραπεία**

Η ταμοξιφένη και οι παρεμποδιστές της αρωματάσης είναι τα κύρια αντι-ορμονικά σκευάσματα για ER (+) όγκους. Από την έκφραση γονιδίων σε ιστούς από καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο και από ER(+) κυτταρικές σειρές έχουν ταυτοποιηθεί και αναγνωριστεί πολλά miRNAs τα οποία συσχετίζονται με το καθεστώς έκφρασης των

οιστρογονικών υποδοχέων και μερικά α miRNAs, τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία με ταμοξιφένη. Στην ομάδα αυτών των miRNAs ανήκουν και τα miR-221 και miR-222. Προηγούμενες μελέτες κατέδειξαν ότι τα miR-221 και miR-222 σχετίζονται με μειωμένη έκφραση των ER και p27 (206). Σε μία έρευνα αποδείχτηκε ότι τα exo-miR-221 και exo-miR-222 μπορούν να μεταφερθούν από ταμοξιφένη ανθεκτικά MCF7 σε ταμοξιφένη ευαίσθητα MCF7 κύτταρα και μπορούν να αυξήσουν την αντίσταση στη ταμοξιφένη στα κύτταρα παραλήπτες μέσω ρύθμισης των δύο αυτών στόχων (178). Θα ήταν ενδιαφέρον να διαπιστώσουμε εάν άλλα miRNAs συνδέονται με την αντι-ορμονική αντίσταση (όπως τα miR-342 και miR-519a) σχετίζονται με την ανάπτυξη αντίστασης στην ορμονό - θεραπεία μέσω εξοσωμικής μεταβίβασης (163,207).

### **5.6 Exo-miRNAs προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα και αντίσταση στη χημειοθεραπεία**

Ο συνδυασμός ανθρακυκλινών (anthracyclines), κυκλοφωσφαμίδης (cyclophosphamide), και / ή ταξανών (taxanes) είναι ο βασικός κορμός των περισσότερων χημειοθεραπευτικών θεραπευτικών αγωγών όσον αφορά τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Αρκετά miRNAs (συμπεριλαμβανομένων των miR-21, miR-29a, miR-100, miR-221 και miR-222) έχει αποδειχτεί ότι τροποποιούν την αντίσταση στη χημειοθεραπεία στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού, και συγκεκριμένα σε χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, όπως η δοξορουβικίνη και η δοκεταξέλη (doxorubicin & docetaxel) (208,209). Ενώ αυτές οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε εσωτερικές αλλαγές επί των καρκινικών κυττάρων και συγκεκριμένα σε αλλαγές που αφορούν στην έκφραση miRNAs, πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει ρόλους τους οποίους παίζουν τα ίδια miRNAs σε εξοσώματα όσον αφορά στην ανάπτυξη χημειο-αντίστασης. Τα εξοσώματα που προέρχονται από αδριαμυκίνη-ανθεκτικά ή δοκεταξέλη ανθεκτικά MCF7 κύτταρα μπορούν να μεταβιβάσουν χημειοαντίσταση ακόμη και σε ευαίσθητα, στα εν λόγω φάρμακα, καρκινικά κύτταρα MCF7. Αντίστοιχα, για τα miR-30a, miR-17, miR-100 και miR-222 έχει παρατηρηθεί ότι έχουν αυξημένη έκφραση στα κύτταρα MCF7 κατόπιν θεραπείας με φαρμακευτικά σκευάσματα και όταν τα εν λόγω microRNAs εντοπίζονται σε εξοσώματα προερχόμενα από κύτταρα που έχουν προηγουμένως λάβει θεραπεία (179). Αυτά τα εξοσώματα πιστεύεται ότι διαμεσολαβούν, τουλάχιστον εν μέρει, στην εμφάνιση χημειοανθεκτικών αποτελεσμάτων.

Διαμόλυνση με miRNA, όπως το miR-29a και / ή το miR-222 μιμούμενα RNAs, γονικών κυττάρων MCF7 αυξάνει την αντίσταση είτε στην αδριαμυκίνη ή στη δοκεταξέλη, ενώ η διαμόλυνση με miR-222 παρεμποδιστές αυξάνει την ευαισθησία στα φάρμακα αυτά (180-183,210). Τα δύο αυτά μόρια miRNAs μειώνουν την έκφραση του PTEN (downregulation),

το οποίο μπορεί και να ευθύνεται για τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τα κύτταρα που έχουν λάβει τα εξοσωμάτια με τα μόρια miR-29 και / ή miR-222 παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά αυτά σκευάσματα. Ωστόσο, η πιθανότητα αυτή δεν ελέγχθηκε άμεσα. Έτερη μελέτη ανέλυσε τις μεταβολές των επιπέδων exo-miRNAs σε σειρές (sub-lines) MDA-MB-231 που ανέπτυξαν αντίσταση στη δοκεταξέλη, επιρουμπικίνη, ή στη βινoreλμπίνη (docetaxel, epirubicin&vinorelbine) (174). Η έκφραση δέκα μορίων miRNAs αυξήθηκε σε κύτταρα (upregulation) και τα οποία αυτά μόρια φορτώθηκαν σε αυξημένο αριθμό αντιγράφων σε εξοσώματα από δοκεταξέλη ανθεκτικά κύτταρα MDA-MB-231. Κανένα από αυτά τα miRNAs δεν αντιπροσωπεύονταν στην κατηγορία miRNAs - signatures, ως σήμα κατατεθέν, και μόνο δύο κοινά miRNAs (miR-138-5p και miR-210-3p) ήταν παρόντα σε επιρουμπικίνη και βινoreλμπίνη ανθεκτικά signatures. Παρόλα αυτά, η λειτουργική συμβολή αυτών των exo-miRNAs δεν διερευνήθηκε. Επιπροσθέτως, από τη μελέτη και άλλων μελετών μπορούμε να διαπιστώσουμε την ειδική συμβολή διαφορετικών miRNAs στην τροποποίηση της χημειοαντίστασης και άλλων χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων. Η εισαγωγή exo-miR-134 σε TNBC καρκινικές σειρές τύπου Hs578Ts(i)8 φάνηκε ότι μειώνει τη διεισδυτική ικανότητα τους και αυξάνει την ευαισθησία στο φαρμακευτικό σκεύασμα, του οποίου η δράση στοχεύει στο Hsp90 (187). Η μείωση της έκφρασης και κατ'επέκταση της παραγωγής των πρωτεϊνών STAST5 και Hsp90 μέσω της δράσης του exo-miR-134, παρόλο που δεν θεωρείται τόσο σημαντική (πραγματοποιείται στα πλαίσια μίας lipofectamine - μεσολαβούμενης διαμόλυνσης), έχει προταθεί ως ο κύριος μοριακός μηχανισμός για την εμφάνιση των παρατηρούμενων φαινοτύπων. Η αποκατάσταση της δραστηριότητας του miR-134 μέσω διαμόλυνσης ενίσχυσε σημαντικά τους cisplatin - μεσολαβούμενους αποπτωτικούς ρυθμούς (187).

### **5.7 Exo-miRNAs προεργόμενα από καρκινικά κύτταρα ευνοούν τη διείσδυση και την εμφάνιση μεταστάσεων**

Μέλη της οικογένειας miR-200 αποτελούν κυρίαρχοι ρυθμιστές της συντήρησης των επιθηλιακών προγραμμάτων (maintenance of epithelial programs) αφού η δράση τους στοχεύει στην μείωση της έκφρασης των ZEB1/2 μεταγραφικών καταστολέων της E-cadherins και άλλων επιθηλιακών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και των μελών της οικογένειας miR-200. Τα μέλη της οικογένειας miR-200 είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της επιθηλιακής διαφοροποίησης, την καταστολή της επιθηλιο - μεσεγχυματικής μετάβασης (E-MT) και επιπλέον ενισχύουν την μεσεγχυμα - επιθηλιακή μετάβαση των κυτταρικών στοιχείων (M-ET mesenchymal-epithelial transition). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μέλη της οικογένειας miR-200 διευκολύνουν το σχηματισμό μεταστατικών εστιών μέσω διέγερσης του

M-ET μηχανισμού και τον πολλαπλασιασμό σε απομακρυσμένες θέσεις των καρκινικών κυττάρων με E-MT φαινότυπο ή διατηρώντας έναν επιθηλιακό φαινότυπο στα αποικίζοντα καρκινικά κύτταρα χωρία να έχουν υποστεί E-MT (211). Σε έρευνες που βασίστηκαν σε μοντέλα συγγενικών ποντικών (syngeneic mouse models) παρατηρήθηκε ότι exo-miR-200 από κυτταρικές σειρές με υψηλό μεταστατικό δυναμικό, στις οποίες εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό μέλη της οικογένειας miR-200, ενισχύθηκε το μεταστατικό δυναμικό των μη μεταστατικών καρκινικών κυττάρων (τα οποία και δεν εξέφραζαν τα παραπάνω miRNAs) (189).

Η ενδοφλέβια χορήγηση δια βελόνης στον ουραίο φλεβικό κλάδο πειραματοζώων (tail-vein) μη μεταστατικών κυττάρων 4T07, που προηγουμένως είχαν επωαστεί με εξοσώματα προερχόμενα από 4T1 επιθηλιακά κύτταρα (κύτταρα επιθηλιακά με υψηλό μεταστατικό δυναμικό και με υψηλή έκφραση των miR-200s) οδήγησε σε σημαντικού βαθμού αύξηση της επίπτωσης των μεταστατικών εστιών στον πνεύμονα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι, μικρού μεγέθους πρωτοπαθείς όγκοι στους οποίους εκφράζονται τα miR-200s αλλά δεν παρουσιάζουν μεταστατικό δυναμικό, ήταν ικανά να χορηγήσουν την ικανότητα μετάστασης σε κύτταρα 4T07 (τα οποία εισήχθησαν μέσω του ουραίου φλεβικού κλάδου) μέσω των exo-miR-200s. Σε μερικές μελέτες για τον καρκίνο του μαστού, η έκφραση του miR-10b συσχετίστηκε με την επίπτωση εμφάνισης μεταστατικών εστιών, ενώ η -σε μη μεταστατικά καρκινικά του μαστού κύτταρα- διέγερση της έκφρασης του miR-10b οδήγησε σε αύξηση του μεταστατικού τους δυναμικού (212). Επιπλέον έχει φανεί ότι τα exo-miR-10b, τα οποία εκκρίνονται από MDA-MB-231 μεταστατικά κύτταρα, αυξάνουν την ικανότητα διείσδυσης των HLME - μη κακοήθων απαθανοτοποιημένων επιθηλιακών κυττάρων του ανθρώπινου μαστού μέσω μείωσης της έκφρασης γνωστών μοριακών στόχων, των HoxD10 και KLF4 (188).

Ενώ λοιπόν, τα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα exo-miRNAs φαίνεται ότι μεταβιβάζουν λειτουργίες και ιδιότητες σε άλλα προ-κακοήθη ή κακοήθη επιθηλιακά κύτταρα, άλλα exo-miRNAs μεταφέρονται σε μη καρκινικά κύτταρα λήπτες για να προάγουν την εμφάνιση μετάστασης. Το miR-9 θεωρείται ένα προ-μεταστατικό miRNA, το οποίο τροποποιεί την έκφραση της E-cadherin στα καρκινικά κύτταρα. Η μεταφορά του exo-miR-9 σε φυσιολογικούς ινοβλάστες μπορεί να ενισχύσει την μετατροπή τους σε όγκο - σχετιζόμενους ινοβλάστες (TAFs) και να υποστηριχτεί έτσι ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων (190). Επιπλέον η μελέτη έδειξε ότι, οι TAFs προερχόμενοι από επιθετικού τύπου TNBC εξέφραζαν υψηλότερα επίπεδα miR-9 συγκριτικά με τους υπόλοιπους υποτύπους (190). Μάλιστα, exo-miR-9 προερχόμενα από TAF μπορούν να μεταφερθούν σε καρκινικά κύτταρα, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την έκφραση του miR-9 και μειώνοντας την έκφραση της E-cadherin. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που

παρέλαβαν εξοσώματα τύπου exo-mir-105, παρουσίασαν μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης στενής δέσμησης (tight junction protein), της ZO-1 (192). Το ανωτέρω γεγονός οδηγεί σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και εξαγγείωσης των κυττάρων του καρκίνου του μαστού σε απομακρυσμένες εστίες και όργανα (192). Παρομοίως, η δράση του exo-miR-181c στον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό φαίνεται ότι αυξάνει τη βατότητα του για τα καρκινικά κύτταρα του μαστού, τα οποία και εμφυτεύονται ευκολότερα στον εγκέφαλο (193). Το exo-miR-181c στοχεύει την 3 – φωσφοροϊνσιτιδό – εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση-1 (PDPK1 , 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα, το οποίο οδηγεί σε παθολογική διάταξη των ινιδίων και δυναμική των μορίων ακτίνης (actin dynamics), με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση των διακυτταρικών δεσμών (193). Το exo-miR-122 μπορεί να αναπρογραμματίσει το μεταβολισμό της γλυκόζης των μη καρκινικών κυττάρων (σε μια προ-μεταστατική εστία), συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών στον πνεύμονα, των αστροκυττάρων και νευρώνων στον εγκέφαλο. Κατά αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών, τα οποία και χρησιμοποιούνται από τα εισβάλλοντα καρκινικά κύτταρα (191). Τόσο in vitro, όσο και in vivo, έχει φανεί ότι το exo-miR-122, δρώντας επί μη καρκινικών κυττάρων όπου και εισέρχεται, μειώνει την έκφραση της pyruvate – κινάσης καθώς και τη χρήση γλυκόζης στα κύτταρα αυτά (191).

### **5.8 Ρύθμιση της αγγειογένεσης από εξοσώματα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα και μεσεγχυματικά stem cells**

Το (docosahexaenoic acid) δοκοσαχεξανοϊκό οξύ (DHA) είναι ένα φυσική χημική ένωση με αντι – αγγειογενετικές ιδιότητες, το οποίο είναι υπό μελέτη ως ένα συμπλήρωμα διατροφής στα πλαίσια της θεραπείας και πρόληψης του καρκίνου του μαστού. Η in vitro θεραπεία με DHA μεταβάλλει το ρυθμό έκκρισης και το φορτίο σε miRNAs των MCF7 και άλλων κυτταρικών σειρών του καρκίνου του μαστού (194). Οι κυριότερες μεταβολές αφορούσαν τα ακόλουθα exo-miRNAs : exo-let-7s, exo-miR-21, exo-miR-23a, exo-miR-27a/b και exo-miR-320 (194). Τα εξοσώματα, τα οποία προέρχονταν από MCF7 κύτταρα (τα οποία είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε DHA) και άσκησαν δράση έναντι της ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς EA.hy926, προκάλεσαν μείωση της έκφρασης των ανωτέρω miRNAs καθώς και μείωση στο σχηματισμό σωληνωδών δομών. Επιπλέον, η διαμόλυνση των κυττάρων EA.hy926 με miR-23b και με μία μιμητική χημική ένωση του miR-320, μείωσε τόσο το σχηματισμό σωληνωδών δομών όσο και την έκφραση των προ-αγγειογενετικών γονιδίων στόχων τους (πχ. PLAU, AMOTL1, NRP1 και ETS2) (194). Τα εξοσώματα προερχόμενα από μεσεγχυματικά stem cells (MSCs) στο TME μπορούν να ασκήσουν αντι-αγγειογενετική δράση μέσω της μείωσης της ρύθμισης του VEGF (ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός



παράγοντας) στα καρκινικά κύτταρα, όπου και εισέρχονται. Τα exo-miR-16, τα οποία προέρχονται από MSCs θεωρείται ότι συμβάλλουν εν μέρει στη ρύθμιση του αντι-αγγειογενετικού αυτού μηχανισμού, ενώ είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν απευθείας την έκφραση του VEGF (194).

### **5.9 Τα exo-miRNAs προερχόμενα από στρωματικά κύτταρα τροποποιούν τις ιδιότητες των ομοίων με stem cells καρκινικών κυττάρων (cancer stem cell like)**

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προ-λιποκυττάρων και των καρκινικών κυττάρων προωθούν των ανάπτυξη του όγκου και τη διασπορά των μεταστατικών εστιών. Τα εξοσώματα που προέρχονται από τα λιποκύτταρα ευθύνονται για το σχηματισμό εστιών αποτελούμενων από stem-cell ομοιάζοντα κύτταρα. Στα πλαίσια πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν κυτταρικές καλλιέργειες όπου (ως μοντέλο πρόιμου καρκίνου του μαστού) χρησιμοποιήθηκαν προ-λιποκύτταρα ποντικού (3T3L1 και MDF10-DDCIS τύπου). Από τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκε ένα εξόσωμα, το exo-miR-140, προερχόμενο από προ-λιποκύτταρα, το οποίο στοχεύοντας το SOX9 μειώνει σημαντικά την ανανέωση των stem-cell ομοιαζόντων καρκινικών κυττάρων καθώς και την κυτταρική μετανάστευση τους (186). Η χορήγηση σε 3T3L1 κύτταρα ενός κινεζικής προέλευσης φυτικού σκευάσματος (ναφθοκουινόνης – naphthoquinone) προκάλεσε αύξηση της έκκρισης exo-miR-140 (186). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με MCF10DCIS κύτταρα στα οποία χορηγήθηκαν εξοσώματα προερχόμενα από 3T3L1 κύτταρα (στα οποία προηγουμένως είχε χορηγηθεί shikonin) στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση της αύξησης των κυττάρων. Αντίθετα, σε κυτταρικές καλλιέργειες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν εξοσώματα προερχόμενα από κύτταρα, που δεν είχαν λάβει προηγουμένως κάποιο σκεύασμα, παρατηρήθηκε αύξηση των κυττάρων του καρκίνου του μαστού (σε in vivo μοντέλα μόνο) (186). Είναι γνωστό ότι το σκεύασμα shikonin παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, τόσο έναντι ιών όσο και αντι-αγγειογενετικές. Η ρύθμιση του φορτίου εξοσωμάτων με miRNA φαίνεται πως είναι μια από τις πλέον σύνθετες δράσεις της ουσίας αυτής (της shikonin). Ενώ η χορήγηση shikonin σε 3T3L1 κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή (κατά τρόπο ειδικό – preferential) exo-miR-140, η αντίστοιχη χορήγηση της σε MCF7 κύτταρα μειώνει την παραγωγή exo-miR-128 (που αποτελεί ένα προ-αυξητικό εξόσωμα με αντι-αποπτωτική δράση) (184).

Τα εξοσώματα που προέρχονται από τα TAFs ρυθμίζουν συν τοις άλλοις τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την E-MT των καρκινικών κυττάρων και τη βιολογική δραστηριότητα (capacity) των stem-cell ομοιαζόντων κυττάρων. Τα exo-miR-21, exo-miR-143 και exo-miR-

378e αποτελούν εξοσώματα προερχόμενα κυρίως από TAFs σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες (185). Πραγματοποιήθηκαν σε μελέτες καλλιέργειες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν εξοσώματα προερχόμενα από TAFs μαζί με BT549, MDA-MB-231 ή T47D και στις οποίες παρατηρήθηκε αύξηση της αγκυροβόλησης (anchorage) - εξαρτώμενης και αγκυροβόλησης – ανεξάρτητης αύξησης των καρκινικών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, στις ανωτέρω καλλιέργειες παρατηρήθηκε αύξηση των μεσεγχυματικών και stem-cell ομοιαζόντων δεικτών (markers) (185). Πριν από την καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών με εξοσώματα προερχόμενα από ινοβλάστες, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση φυσιολογικών ινοβλαστών με miR-21, miR-143 και μιμητικού τύπου miR-378e, με αποτέλεσμα την αναπαραγωγή ενισχυμένων κακοήθων φαινοτύπων όσον αφορά τα κυτταρικά στοιχεία του καρκίνου του μαστού. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει το σημαντικό λειτουργικό ρόλο που παίζουν τα προερχόμενα από TAFsexo-miRNAs (185).

#### **5.10 Η ρύθμιση της αδράνειας (dormancy) των καρκινικών κυττάρων από Exo-miRNAs προερχόμενα από στρωματικά κύτταρα**

Μεταστατικές εστίες στο μυελό των οστών μπορεί να αναπτυχθούν ακόμη και μετά από το πέρας δεκαετιών από την αρχική διαγνώσει του όγκου. Τα στρωματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των MSCs, αλληλεπιδρούν στο μικροπεριβάλλον του οστού με διασπειρόμενα καρκινικά κύτταρα μέσω φυσικής επαφής, οδών σηματοδότησης του παρακρινικού συστήματος και μεταφοράς εξοσωμάτων. Το στρωματικό στοιχείο του μυελού των οστών μπορεί να επάγει την αδράνεια των καρκινικών κυττάρων και να διατηρήσει τα κύτταρα αυτά ανενεργά μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε καλλιέργειες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν στρώμα μυελού των οστών μαζί με MDA-MB-231 ή με καρκινικά κύτταρα του μαστού T47D, προκλήθηκε η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0 (196). Τα εξοσώματα (προερχόμενα από τα κύτταρα του μυελού των οστών) exo-miR-127, exo-miR-197, exo-miR-222 και το exo-miR-223 εισήχθησαν στα κύτταρα T47D και κατόπιν υπό τη δράση των miRNAs, που έφεραν, κατέστειλαν την έκφραση του CXCL12. Το CXCL12 αποτελεί μια χημειοκίνη, η οποία αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς CXCR4 και CXCR7. Απώλεια των CXCL12 στα καρκινικά κύτταρα διακόπτει τη φυσική τους αλληλεπίδραση με τα αρχέγονα (stem-cells) αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν CXCR4 υποδοχείς, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα περισσότερο εχθρικό μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξή τους. Ενώ το ανωτέρω φαίνεται ότι αποτελεί έναν ογκο-κατασταλτικό μηχανισμό για τον περιορισμό της ανάπτυξης μεταστατικών εστιών, τελικά τα καρκινικά κύτταρα, που αδρανοποιούνται, μπορεί να καταστούν περισσότερο ανθεκτικά στη χορηγηθείσα

αντικαρκινική χημειοθεραπεία (197). Τα MSCs-προερχόμενα εξοσώματα από αρχέγονα (naïve) κύτταρα (που δεν έχουν εκτεθεί ή έχουν αλληλεπιδράσει με καρκινικά κύτταρα) δεν προκαλούν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0. Μόνο τα εξοσώματα από πρωταρχικά (primed) MSCs (που έχουν εκτεθεί ή έρθει σε επαφή με καρκινικά κύτταρα) προκαλούν την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, όπως αρχικά αναφέρθηκε (196,197). Τα εξοσώματα (exo-miR-222 και exo-miR-223) παράγονται πέντε φορές περισσότερο από τα (primed) MSCs σε σύγκριση με τα (naïve) MSCs και παρέχουν προστασία σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού έναντι της καρμποπλατίνης (carboplatin). Σε ένα *in vivo* μοντέλο αδράνειας κυττάρων καρκίνου του μαστού (σε μηριαίο οστό), η διαμόλυνση των MSCs με anti-miR-222/223 παρεμποδιστές πριν την εμφύτευσή τους στο οστό, ευαισθητοποίησε τα καρκινικά κύτταρα του μαστού σε χαμηλές δόσεις καρμποπλατίνης (ως θεραπευτικό σκεύασμα) παρεμποδίζοντας είτε τη μεταφορά αντί – miR-222/223 ή τη μεταφορά exo-miR-222/223 προερχόμενων από MSCs κύτταρα, στα καρκινικά κύτταρα (197).

Η ανωτέρω μελέτη δεν διερεύνησε ποιος ή ποιοι παράγοντας/ες των καρκινικών κυττάρων προκάλεσε *priming*. Σε καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν με BM2 (μίας υπο-σειράς MDA-MB-231 που παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα σχηματισμού μεταστατικών εστιών στο μυελό των οστών) και με MSCs (που ελήφθησαν από ανθρώπους – δότες) παρατηρήθηκε καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και μείωση των ιδιοτήτων των αρχέγονων κυττάρων και της μεταναστευτικής ικανότητας των BM2 κυττάρων (195). Το exo-miR-23b εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ποσότητα όσον αφορά το φορτίο εξοσωμάτων - προερχομένων από MSC (σε σύγκριση με τα εξοσώματα που παράγονται από ινοβλάστες ενηλίκων ατόμων). Το MARCKS ταυτοποιήθηκε ως ένας στόχος – κλειδί του exo-miR-23b επί των κυττάρων BM2, όπου ασκεί δράση (195). Τέλος όπως έδειξε η μελέτη σε μία κοόρτη 10 ασθενών, η έκφραση του miR-23b αυξήθηκε επί των οστικών μεταστάσεων σε σύγκριση με τις πρωταρχικές εστίες στο μαστικό αδένα, ενώ η έκφραση του MARCKS μειώθηκε. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι το miR-23b μεσολαβεί στο μηχανισμό ρύθμισης του βαθμού αδράνειας των καρκινικών κυττάρων (195).

Πίνακας 6

Exo-miRNA(s)	Donor Cell	Recipient Cell	Biological Activity	Evidence	Gene Target(s)	Experimental System
miR-221, miR-222	Cancer cell	Cancer cell	Hormonal resistance	Functional (exosome transfer)	ER, p27	in vitro (MCF7)
miR-17, miR-30a, miR-100, miR-222	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (adriamycin, docetaxel)	Differential exosomal representation		in vitro (MCF7)
miR-29a, miR-30a, miR-100, miR-196a, miR-222	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (adriamycin, docetaxel)	Differential exosomal representation		in vitro (MCF7)
miR-20a, miR-23a, miR-24, miR-149, miR-222	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (adriamycin)	Increased levels in recipient cells suggestive of exosomal transfer		in vitro (MCF7)
miR-29a	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (adriamycin)	Functional (transfection), differential exosomal representation	PTEN	in vitro (MCF7)
miR-29a, miR-222	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (adriamycin, docetaxel)	Functional (transfection)	PTEN	in vitro (MCF7)
miR-222	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (adriamycin)	Functional (transfection), differential exosomal representation	PTEN	in vitro (MCF7)
miR-222	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (adriamycin)	Functional (transfection), differential exosomal representation		in vitro (MCF7)
miR-138-5p, miR-139-5p, miR-197-3p, miR-210-3p, miR-423-5p, miR-574-3p, miR-744-5p, miR-3178, miR-4258, miR-4443, miR-6780b-3p	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (epirubicin)	Differential exosomal representation		in vitro (MDA-MB-231)
miR-138-5p, miR-140-3p, miR-210-3p, miR-3613-5p, miR-149-3p, miR-423-5p, miR-671-5p, miR-1246, miR-1268a, miR-4298, miR-4438, miR-4644, miR-7107-5p, miR-7847-3p	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (vinorelbine)	Differential exosomal representation		in vitro (MDA-MB-231)
	Cancer cell	Cancer cell	Drug resistance (docetaxel)	Differential exosomal representation		in vitro (MDA-MB-231)

Πίνακας 7

Exo-miRNA(s)	Donor Cell	Recipient Cell	Biological Activity	Evidence	Gene Target(s)	Experimental System
let-7, miR-21, miR-23a, miR-27a/b, miR-320	Cancer cell	Endothelial cell	Angiogenesis	Functional (exosome transfer, docosahexaenoic acid)		in vitro (MCF7, EA.hy926)
miR-23, miR-320	Cancer cell	Endothelial cell	Angiogenesis	Functional (transfection)	PLAU, AMOTL1, NRPI, ETS2	in vitro (MCF7, EA.hy926)
miR-16	MSC	Cancer cell	Angiogenesis	Functional (exosome transfer)	VEGF	in vitro, in vitro allograft (murine MSC, 4T1)
miR-23b	MSC	Cancer cell	Dormancy, drug resistance (docetaxel)	Functional (exosome transfer)	MARCKS	in vitro (MDA-MB-231, BM2, MSC)
miR-127, miR-197, miR-222, miR-223	MSC	Cancer cell	Dormancy	Functional (exosome transfer)	CXCL12	in vitro, in vivo xenograft (MSC, MDA-MB-231, T47D)
miR-222, miR-223	MSC	Cancer cell	Dormancy, drug resistance (carboplatin)	Functional (exosome transfer, transfection)		in vitro, in vivo xenograft (MSC, MDA-MB-231, T47D)

Πίνακας 8

Exo-miRNA(s)	Donor Cell	Recipient Cell	Biological Activity	Evidence	Gene Target(s)	Experimental System
miR-128	Cancer cell	Cancer cell	Proliferation	Functional (exosome transfer, shikonin)	BAX	in vitro (MCF7)
miR-21, miR-143, miR-378e	Fibroblast	Cancer cell	Proliferation, stem cell renewal, and invasion	Functional (exosome transfer, transfection)		in vitro (patient-derived fibroblasts, BT549, MDA-MB-231, T47D)
miR-140	Preadipocyte	Cancer cell	Proliferation, stem cell renewal	Functional (shikonin)	SOX9	in vitro, xenograft (3T3L1, MCF10DCIS)
miR-503	Endothelial cell	Cancer cell	Proliferation and invasion	Functional (exosome transfer)	CCND2, CCND3	in vitro (HUVEC, MDA-MB-231)
miR-134	Cancer cell	Cancer cell	Migration and invasion	Functional (exosome transfer)	STAT5B	in vitro (Hs578Ts)(8)
miR-10b	Cancer cell	Epithelial cell	Migration and invasion	Functional (exosome transfer)	HoxD10, KLF4	in vitro (MDA-MB-231, HMLE)
miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429	Cancer cell	Cancer cell	Metastatic potential	Functional (exosome transfer), differential exosomal representation		in vitro, in vivo allograft (4T07, 4T01E)
miR-9	Cancer cell	Fibroblast	Metastatic potential	Functional (exosome transfer), differential exosomal representation		in vitro (MDA-MB-231, MDA-MB-468, patient-derived fibroblasts)
miR-9	Fibroblast	Cancer cell	Metastatic potential	Functional (exosome transfer), differential exosomal representation	E-cadherin	in vitro, in vivo xenograft (fibroblasts, MDA-MB-231, MDA-MB-468)
miR-122	Cancer cell	Fibroblast, neurons, microglia	Metabolic reprogramming, metastatic niche	Functional (exosome transfer)	Pyruvate kinase (PKM2), Citrate synthase (CS)	in vitro, in vivo xenograft (MCF10DCIS.com, MDA-MB-231, murine brain cortical neurons, murine lung fibroblasts)
miR-105	Cancer cell	Endothelial cell	Vascular permeability, extravasation	Functional (exosome transfer)	ZO-1	in vitro, in vivo xenograft (MDA-MB-231, HMVECs)
miR-181c	Cancer cell	Endothelial cell	Vascular permeability, extravasation	Functional (exosome transfer)	PDPK1	in vitro (MDA-MB-231.D3H2LN, endothelial cells)

Στους (Πίνακες 6-7-8) παρουσιάζονται συνοπτικά η βιολογική δραστηριότητα των miRNAs όπως παρουσιάστηκαν στην εργασία - review Exosomal MicroRNAs in Breast Cancer towards Diagnostic and Therapeutic Applications (Sempere et al, [Cancers \(Basel\)](#). 2017 Jun 24;9(7). pii: E71. doi: 10.3390/cancers9070071).

## **6 - Ο ρόλος των miRNAs στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού σε σχέση με BRCA1 μεταλλάξεις**

### **6.1 Εισαγωγικά**

Τα γονίδια BRCA κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη λειτουργία του μηχανισμού επιδιόρθωσης διπλών θραύσεων της διπλής έλικας του DNA. Συμμετέχουν στη διαδικασία της αναγνώρισης και οργάνωσης της λειτουργίας επιδιόρθωσης των διπλών θραύσεων (DBSs) στο γενετικό υλικό μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR). Εάν και τα δύο αντίγραφα – αλληλόμορφα των γονιδίων BRCA (είτε του BRCA1 είτε του BRCA2) είναι μεταλλαγμένα τότε ο HR δεν μπορεί να ξεκινήσει, με αποτέλεσμα να προκληθεί γενωμική αστάθεια, που αποτελεί εύφορο έδαφος για την καρκινόγνεση (29,30).

Τα αλληλόμορφα των γονιδίων BRCA1/2 που εντοπίζονται σε βλαστικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για περίπου το 25% των οικογενών περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και ωοθηκών. οι οποίες κλινικά εκδηλώνονται ως οικογενές (κληρονομούμενο) σύνδρομο καρκίνου μαστού και ωοθηκών (HBOC) (31,32). Μηδενική ή χαμηλή έκφραση του BRCA1 στους καρκινικούς αυτούς όγκους σχετίζεται με καλή κλινικά ανταπόκριση στη θεραπεία με πλατίνες (platinum) και PARP παρεμποδιστές (33). Η μείωση της έκφρασης του BRCA1 μπορεί να οφείλεται σε ένα επιβλαβές αλληλόμορφο βλαστικού κυττάρου σε συνδυασμό με την απώλεια ενός wild-type αλληλομόρφου στα κυτταρικά στοιχεία του όγκου (μίας ιδιοπαθούς αιτιολογίας σωματική μετάλλαξη), που οδηγεί απενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων (35) ή μπορεί να οφείλεται σε μηχανισμούς όπως η παρεμπόδιση της δράσης του p53, η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου ή υψηλή έκφραση του γονιδίου NBR2 (36).

### **6.2 Θεραπεία βασισμένη σε σκευάσματα πλατίνας (platinum) και σε PARP1 παρεμποδιστές και miRNAs**

Η κισπλατίνη (cisplatin) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη θεραπεία τόσο του καρκίνου του μαστού όσο και του καρκίνου των ωοθηκών οι οποίοι όγκοι σχετίζονται με παθολογικές μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA1 (38). Ο μηχανισμός της δράσης του βασίζεται στο σχηματισμό διασταυρουμένων δεσμών τόσο μεταξύ των δύο DNA αλυσίδων όσο και στο εσωτερικό της κάθε αλυσίδας ξεχωριστά. Το γεγονός αυτό εμποδίζει την αντιγραφή του DNA και την κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα το κύτταρο τελικά να οδηγηθεί στην απόπτωση (39). Στη μελέτη τους Byrski και συν. (40) βρέθηκε ότι το 80% των ασθενών με καρκίνο του μαστού, οι οποίοι ήταν φορείς μεταλλαγμένων αλληλομόρφων όσον αφορά το γονίδιο BRCA1 και έλαβαν επικουρική χημειοθεραπεία με κισπλατίνη, εμφάνισαν καλή ανταπόκριση στη

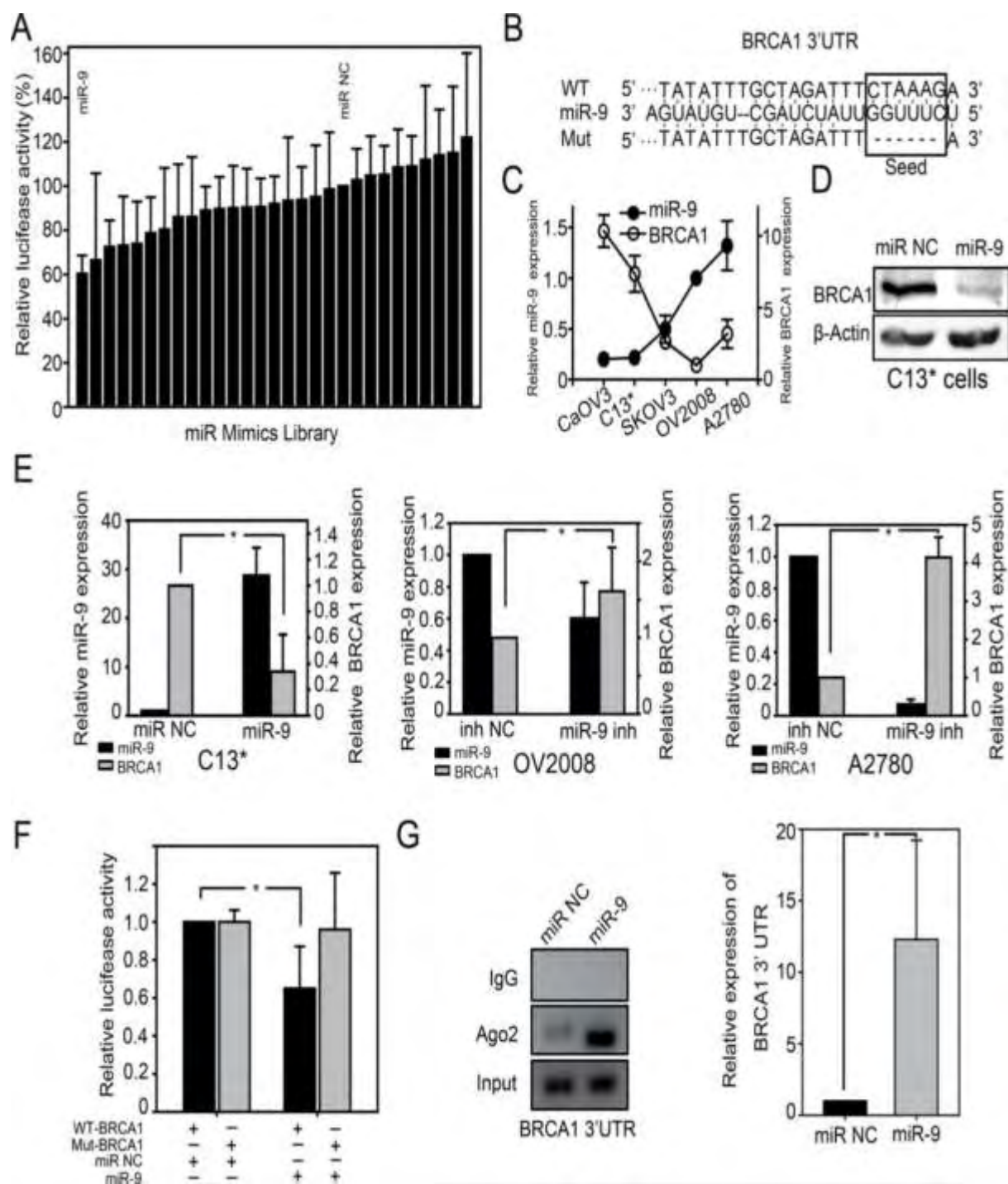
θεραπεία και εξαιρετική πρόγνωση χωρίς υποτροπές της νόσου (progression free survival – PFS - ) (40).

Μία σχετικά νέα και αρκετά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού είναι η χρήση παρεμποδιστών της πολυ- (ADP-ριβόζης) πολυμεράσης (PARP), το οποίο είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει σε διάφορους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των θραύσεων του DNA, μεταξύ των οποίων είναι και ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR). Σε wild type κύτταρα, οι διπλές θραύσεις (DSBs - double strands breaks) επιδιορθώνονται μέσω του μηχανισμού HR, αλλά στην περίπτωση κυττάρων όπου το γονίδιο BRCA1 είναι απενεργοποιημένο (είτε λόγω μετάλλαξης είτε λόγω επιγενετικών τροποποιήσεων) αυτές οι βλάβες δεν επιδιορθώνονται, με αποτέλεσμα να προκαλείται κατακερματισμός του DNA και τελικά κυτταρικά απόπτωση (41) . Η έλλειψη απολύτως λειτουργικών BRCA1 πρωτεϊνών μπορεί εν μέρει να αντισταθμιστεί μέσω των ενζύμων PARP. Εάν οι παρεμποδιστές PARP χρησιμοποιηθούν, οι συνέπειες των BRCA μεταλλάξεων είναι εντονότερες – η πιθανότητα επιδιόρθωσης των DSBs είναι σημαντικά πιο μειωμένη, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (29,30). Τα ανωτέρω δεδομένα δικαιολογούν την εν δυνάμει χρήση των PARP-1 παρεμποδιστών στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Το Olaparib είναι ένας PARP-1 παρεμποδιστής που χρησιμοποιείται (μέχρι το 2017 ο μοναδικός) στην κλινική πράξη. Βάσει των οδηγιών του FDA (Food and Drugs Administration) το Olaparib μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς οι οποίοι έλαβαν τρεις αρχικά κύκλους χημειοθεραπείας και τα καρκινικά κύτταρα εμφάνισαν ευαισθησία στις πλατίνες. Το μέσο PFS, ως αποτέλεσμα της χρήσης των PARP-1 παρεμποδιστών ήταν 11,2 μήνες σε σύγκριση με τους 4,3 μήνες που παρουσίασε η ομάδα του placebo (43).

Τα επίπεδα των miRNAs σε διάφορους τύπους όγκων εμφανίζονται διαφοροποιημένα (είτε λόγω μειωμένης είτε λόγω αυξημένης έκφρασης τους) (34). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα αποτελέσματα της θεραπείας με πλατίνα και PARP-1 παρεμποδιστές στον καρκίνο του μαστού αλλά και στον καρκίνο των ωοθηκών είναι εξαρτώμενοι από τη συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων έκφρασης ορισμένων miRNAs και της μειωμένης έκφρασης του BRCA1.

Πιο συγκεκριμένα στη μελέτη των Sun και συν., εξετάστηκε μία ομάδα miRNAs, τα οποία στοχεύουν στην 3'UTR περιοχή του BRCA1 γονιδίου. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν έξι αλγόριθμοι για την ταυτοποίηση αυτών των miRNAs. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να ταυτοποιηθούν 28 miRNAs, τα οποία εν δυνάμει μπορούσαν να επηρεάσουν την (βάσει του ανωτέρω μηχανισμού) την έκφραση του BRCA1. Εξ'αυτών των miRNAs, το miRNA-9 (miR-9) αποδείχτηκε να είναι το πλέον αποτελεσματικότερο στη μείωση της έκφρασης και της δραστηριότητας του γονιδίου BRCA1 (44) (Εικόνα 20).



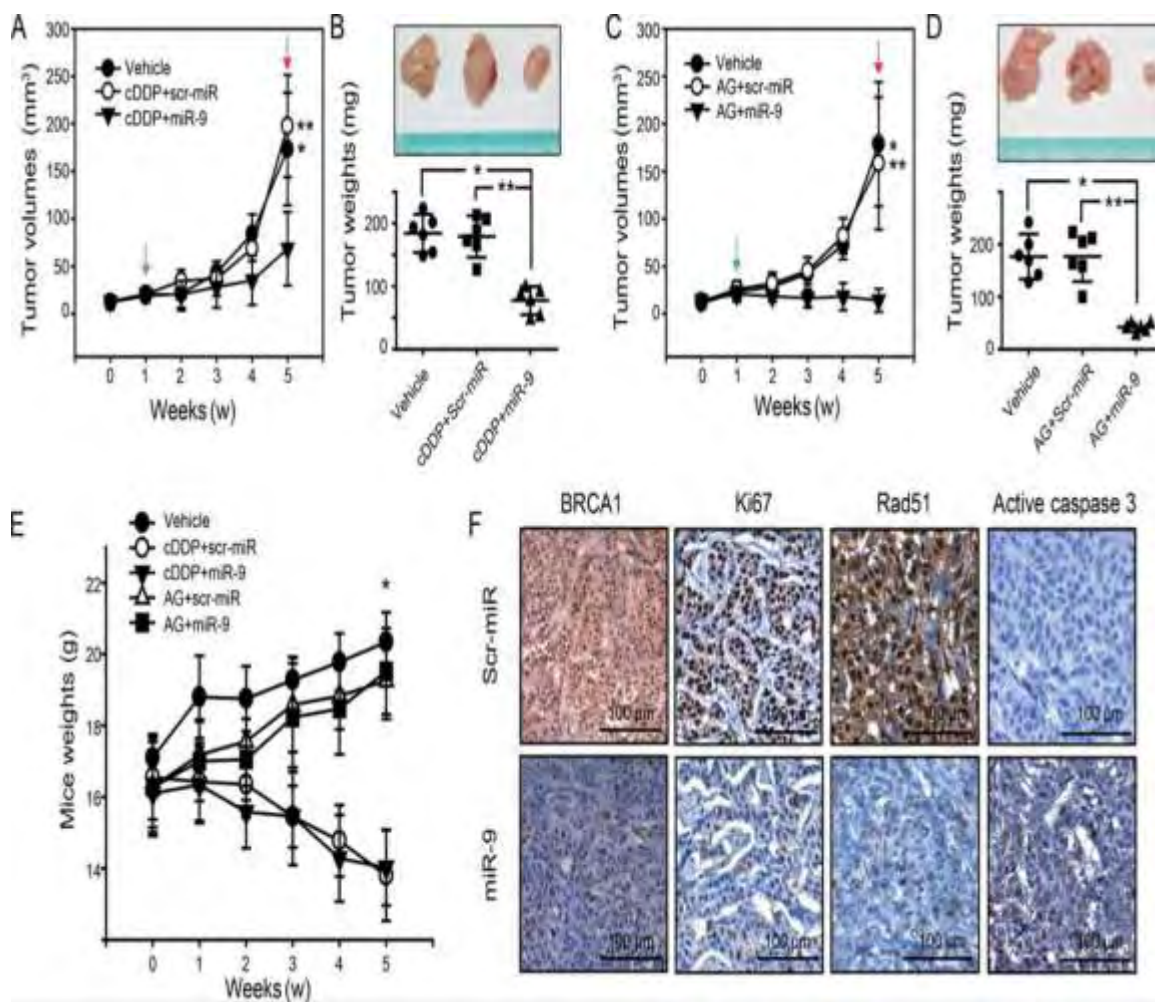


Εικόνα 20:Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας όπως πραγματοποιήθηκε από τους Sun και συν., για την επιλογή του miR-9 (Sun C, Li N, Yang Z, Zhou B, He Y, Weng D, Fang Y, Wu P, Chen P, Yang X, Ma D, Zhou J, Chen G. miR-9 Regulation of BRCA1 and Ovarian Cancer Sensitivity to Cisplatin and PARP Inhibition. JNCI. 2013;105(22)).

Στην ίδια μελέτη, εξετάστηκε δείγμα 58 ασθενών με ορώδες καρκίνο των ωοθηκών (σταδίου IIIc ή IV). Οι ασθενείς έλαβαν ως χημειοθεραπεία το σχήμα platinum/taxane και κατόπιν υπολογίστηκε το PFS. Με τη χρήση μικροσυστοιχιών (από δείγματα καρκινικού ιστού των

ασθενών) καθορίστηκαν α) τα επίπεδα έκφρασης του miR-9 (μέσω in-situ υβριδισμού) και β) τα επίπεδα έκφρασης του BRCA1 (μέσω ανοσοϊστοχημείας) (44). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι χαμηλή έκφραση του BRCA1 και υψηλή έκφραση του miR-9 συσχετίστηκαν με μεγαλύτερο PFS και ευαισθησία στη χρήση platinum. Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μέσω της μελέτης μίας άλλης ομάδας 113 ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Μεταξύ των ασθενών, 45 παρουσίασαν χαμηλή έκφραση του BRCA1 και 63 υψηλή έκφραση του miRNA-9, ενώ στατιστικά σημαντική ήταν και το γεγονός ότι 34 όγκοι με χαμηλή έκφραση BRCA1 και 43 όγκοι με υψηλή έκφραση του miRNA-9 ήταν platinum – ευαίσθητοι (44).

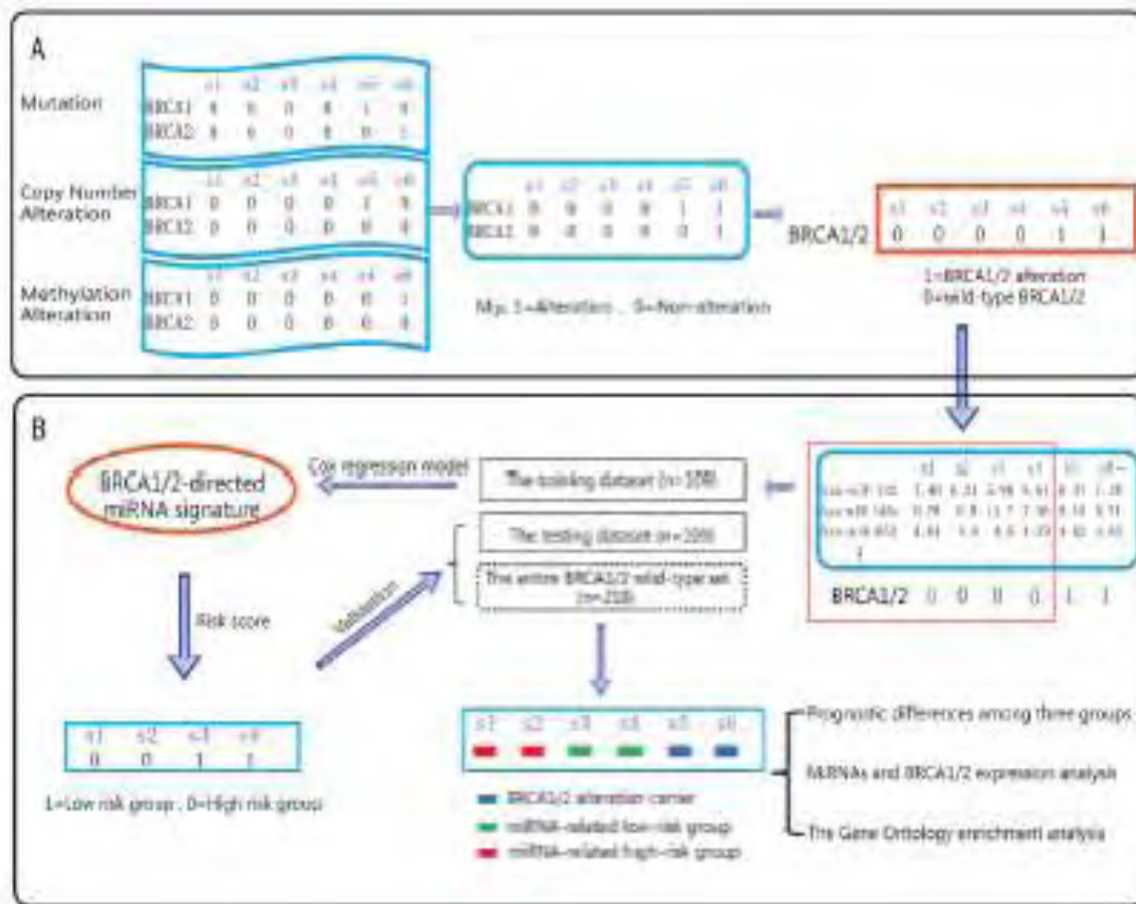
Επίσης οι Sun και συν., πραγματοποίησαν πειράματα που αφορούσαν στην ανταπόκριση στη χορήγηση PARP-1 παρεμποδιστών σε ποντικούς με καρκίνο του μαστού, οι οποίοι υπερέκφραζαν το miRNA-9. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυξημένη έκφραση του miRNA-9 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου στους ποντικούς κατά τη διάρκεια θεραπείας με παρεμποδιστές PARP-1 AG014699 (PARP-1 παρεμποδιστής συν miRNA-9 agomiR: μέσος όγκος καρκινικού όγκου = 14,3 mm<sup>3</sup> , vehicle alone: μέσος όγκος καρκινικού όγκου = 178,8 mm<sup>3</sup>) (44) (Εικόνα 21).



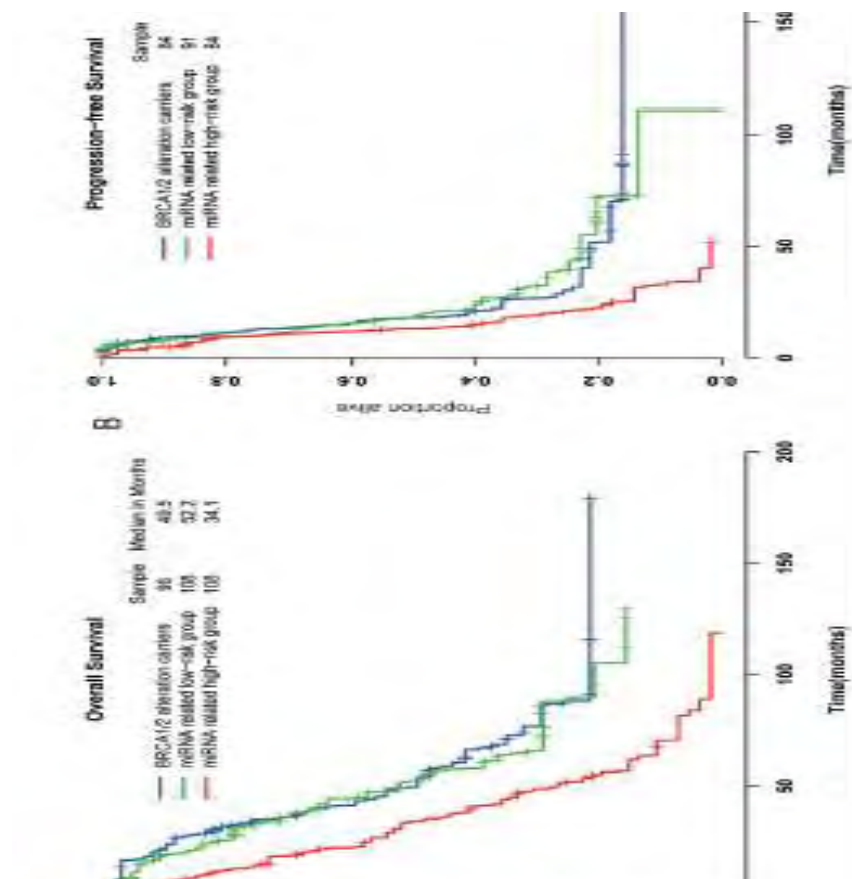
**Εικόνα 21:** Στην εικόνα φαίνεται η δραστική μείωση του μεγέθους του όγκου σε πειραματόζωα που έλαβαν cDDP και miR-9 καθώς και AG μαζί με miR-9 (Sun C, Li N, Yang Z, Zhou B, He Y, Weng D, Fang Y, Wu P, Chen P, Yang X, Ma D, Zhou J, Chen G. miR-9 Regulation of BRCA1 and Ovarian Cancer Sensitivity to Cisplatin and PARP Inhibition. JNCI. 2013;105(22)).

Στη μελέτη των Gu και συν., συμμετείχαν 317 ασθενείς με καρκίνο της ωοθήκης για να διερευνηθεί (σε σχέση με τα γονίδια BRCA1/2) ποιο ή ποια miRNA/s επηρεάζουν την ευαισθησία στη θεραπεία με platinum. Για το λόγο αυτό οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, 218 με wild-type BRCA1/2 και 99 με μεταλλάξεις BRCA1/2 σε σωματικά και γαμετικά κύτταρα (germ line cells). Κάνοντας χρήση δεδομένων από – TCGAportal – συνέλλεξαν πληροφορίες για την έκφραση των miRNAs. Στη συνέχεια, με τη χρήση πολλαπλών αλγορίθμων (πχ TargetScan), ταυτοποιήθηκαν miRNAs που εν δυνάμει ρυθμίζουν την έκφραση BRCA1/2. Η ομάδα των 218 ασθενών (wild type BRCA1/2) διαχωρίστηκε σε δύο υποομάδες, την test και την training. Από τη μελέτη της υποομάδας training ταυτοποιήθηκαν 57 miRNAs τα οποία στοχεύουν την έκφραση των BRCA1/2, και μεταξύ αυτών μελετήθηκαν περαιτέρω εκείνα τα miRNAs που είχαν συσχετιστεί με καλύτερη συνολικά επιβίωση των ασθενών (overall survival – OS) με wild-type μεταλλάξεις των BRCA1/2. Κατ' αυτό τον τρόπο ταυτοποιήθηκαν τρία miRNAs: miRNA-146a, miRNA-

148a και miRNA-545. Επιπλέον, με βάσει το OS – PFS διαχώρισαν τους ασθενείς σε ομάδες miRNA χαμηλού και υψηλού ρίσκου-κινδύνου, κάνοντας χρήση ως cutoff του μέσου σκορ ρίσκου (medianscorerisk). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι χαμηλού κινδύνου ασθενείς είχαν μέση επιβίωση μεγαλύτερη από την ομάδα ασθενών με miRNA υψηλού κινδύνου (μέσο OS = 51,9 έναντι 35,8 μηνών αντίστοιχα) (45)(Εικόνες 22-23).

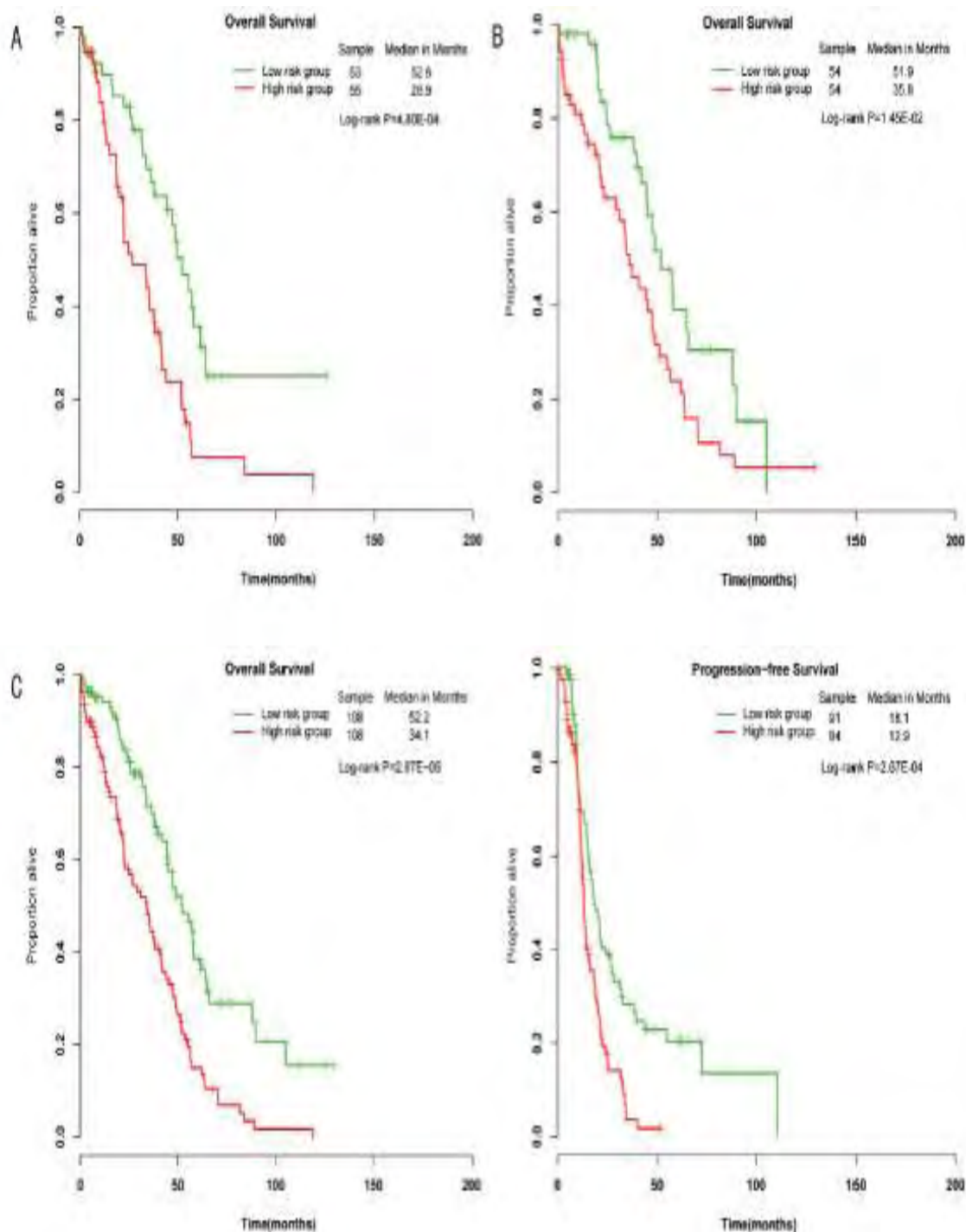


Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας των Gu και συν.



Εικόνα 23: Διαφορές στην επιβίωση και progression-free επιβίωση των τριών ομάδων ασθενών (μπλε γραμμή: φορείς μεταλλαγών των γονιδίων BRCA1/2, πράσινη γραμμή: miRNA σχετιζόμενο με χαμηλού κινδύνου ομάδα ασθενών, κόκκινη γραμμή: miRNA σχετιζόμενο με υψηλού κινδύνου ομάδα ασθενών).





Εικόνα 24: Διαφορές στην επιβίωση και progression free επιβίωση των δύο ομάδων (χαμηλού και υψηλού κινδύνου) σε (A) the training set (B) the testing set (c) the entire wild type-BRCA1/2 set.

Οι εικόνες 22,23,24 προέρχονται από την εργασία των : Gu Y, Zhang M, Peng F, Fang L, Zhang Y, Liang H, Zhou W, Ao L, Guo Z. The BRCA1/2-directed miRNA signature predicts a good prognosis in ovarian cancer patients with wild-type BRCA1/2. Oncotarget. 6(4):2397406.

Επιπροσθέτως στη μελέτη των Gu και συν., οι 317 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών διαιρέθηκαν και σε τρεις άλλες ομάδες: σε φορείς μεταλλάξεων, σε ομάδα miRNA χαμηλού κινδύνου και σε ομάδα miRNA υψηλού κινδύνου. Οι ασθενείς με BRCA1 μεταλλάξεις είχαν σημαντικά μεγαλύτερο OS σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας υψηλού ρίσκου (μέσο OS = 49,5 έναντι 34,1 μηνών αντίστοιχα), ενώ οι ασθενείς χαμηλού ρίσκου είχαν σχεδόν παρόμοιο OS με τους ασθενείς με BRCA1 μεταλλάξεις (μέσο OS = 52,2 έναντι 49,5 μήνες αντίστοιχα). Τα ανωτέρω αποτελέσματα δείχνουν ότι, τα miRNA-146a, miRNA-148a και miRNA-545 παρεμβάλλονται στο μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA μέσω της μείωσης της έκφρασης του BRCA1 γονιδίου (45)(Εικόνα 24).

Σε άλλη μελέτη για το miRNA-146a, των Shen και συν., εξετάστηκαν 42 ασθενείς με οικογενή καρκίνο του μαστού και 82 ασθενείς με οικογενή καρκίνο των ωοθηκών. Με τη χρήση μιας in vitro δοκιμασίας, βρήκαν ότι η παρουσία του πολυμορφισμού (rs2910164) στο miRNA-146a συνδέθηκε με αύξηση της έκφρασης του. Σε σύγκριση με το G αλληλόμορφο, το έτερο (variant) αλληλόμορφο προσδένεται ισχυρότερα στην περιοχή 3'UTR BRCA1, το οποίο σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του BRCA1 (46,47).

Στη μελέτη των Moskwa και συν., με τη χρήση αλγορίθμων πρόβλεψης, έδειξαν ότι το miRNA-182 στοχεύει το BRCA1 στον καρκίνο του μαστού. Για να επιβεβαιώσουν την ύπαρξη ευαισθησίας έναντι της IR (γ – ακτινοβολίας) και των PARP παρεμποδιστών, χρησιμοποίησαν υψηλής έκφρασης miRNA-128 σε κύτταρα MDA-MB231 και χαμηλής έκφρασης miRNA-128 σε κύτταρα 21NT. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι τα κύτταρα MDA-MB231 με υψηλή έκφραση του miRNA-128 ήταν περισσότερο ευαίσθητα στη θεραπεία με IR και PARP παρεμποδιστές. Στην ίδια μελέτη, σε πειράματα σε ποντίκια, φάνηκε ότι η θεραπεία με olaparib (έναν PARP παρεμποδιστή) καθυστερεί την ανάπτυξη όγκων που εκφράζουν miRNA-128 (47,48).

Οι He και συν., με τη χρήση μικροσυστοιχιών, ταυτοποίησαν 19 απορρυθμισμένης έκφρασης miRNAs στην κυτταρική σειρά MCF-7/DDP, συμπεριλαμβανομένων 11 μειωμένης και 8 αυξημένης έκφρασης miRNAs. Ένα εξ'αυτών, το miRNA-218, εμφάνισε σημαντικά μειωμένη έκφραση σε κύτταρα ανθεκτικά στη χορήγηση κισπλατίνης (cisplatin) σε ασθενείς με μεταλλάξεις BRCA1. Οι He και συν., για να αποδείξουν το ανωτέρω στην κλινική πράξη εξέτασαν 85 δείγματα από πρωταρχικές εστίες καρκίνου του μαστού με διαφορετική χημειοευαισθησία στην κισπλατίνη. Καμία σχέση δε βρέθηκε μεταξύ του επιπέδου έκφρασης του miRNA-218 και της ηλικίας εμφάνισης της νόσου, του κλινικού σταδίου ή της ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων (49).

Παρόλα αυτά, συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του δείκτη επιβίωσης στον καρκίνο του μαστού και της έκφρασης του BRCA1. Οι 85 ασθενείς της μελέτης (He et al, 2015) χωρίστηκε σε δύο



ομάδες με βάσει τα επίπεδα έκφρασης του BRCA1 και miRNA-218. Με βάσει τον εκτιμητή Kaplan-Meier φάνηκε μία στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του miRNA-218, της έκφρασης του BRCA1 και της επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (έκφραση του miRNA-218 – χρόνος επιβίωσης σε μήνες : 30,9 σε χαμηλή έκφραση έναντι 42,2 για υψηλή - -- έκφραση του BRCA1 – χρόνος επιβίωσης σε μήνες: 41,9 για χαμηλή έναντι 31,5 σε υψηλή έκφραση) (49).

Στη μια άλλη μελέτη, αυτή των Zavala και συν., χρησιμοποιήθηκαν 39 διαφορετικά δείγματα από τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (τα οποία προηγουμένως είχαν μονιμοποιηθεί σε φορμαλίνη και σκληνωθεί σε κύβους παραφίνης – FFPE -). Σκοπός της μελέτης ήταν η βρεθεί η κλινική σχέση μεταξύ των miRNA-146a και miRNA-638 και της έκφρασης του BRCA1. Η παρουσία BRCA1 αλληλομόρφων (variants) επίσης αξιολογήθηκε. Τρεις ασθενείς έφεραν σε βλαστικά κύτταρα τους μεταλλάξεις BRCA1. Οι μελετητές χώρισαν τους όγκους σε δύο ομάδες, με βάσει το επίπεδο της έκφρασης των ανωτέρω miRNAs και του BRCA1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι γυναίκες ασθενείς με υψηλή έκφραση των miRNA-638, miRNA-146a και ανώμαλη έκφραση του BRCA1 είχαν συνολικά μεγαλύτερη επιβίωση σε σύγκριση με τους ασθενείς που παρουσίαζαν χαμηλή έκφραση των miRNAs και σε φυσιολογικά επίπεδα έκφραση του BRCA1 (50).

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η έκφραση του miRNA-638 είναι απορυθμισμένη σε πολλούς διαφορετικούς καρκινικούς όγκους (48,51). Στη μελέτη των Tan και συν., χρησιμοποιήθηκαν FFPE δειγμάτων από καρκίνο του μαστού καθώς και κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων (από άνθρωπο) με σκοπό να καθοριστεί πως το miRNA-638 επηρεάζει την ευασθησία τριπλά αρνητικών καρκινικών κυττάρων (TNBC) στην IR και την cisplatin. Οι μελετητές με τη χρήση των TARGETSCAN-VERT και miRanda έδειξαν ότι το miRNA-638 ρυθμίζει την έκφραση του BRCA1. Επίσης, τα FFPE δείγματα χωρίστηκαν σε εκείνα που έφεραν φυσιολογικό ιστό και εκείνα με ιστό από καρκίνο του μαστού. κατόπιν από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε RNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miRNA-638 μπορεί να καταστήσει εξαιρετικά ευάλωτα τα TNBC καρκινικά κύτταρα σε παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA, όπως πχ. η χορήγηση cisplatin ή η IR. Παρόλο που, η 5-φλουοουρακίλη και η επιρουμπικίνη ανήκουν στους παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό δεν αναφέρθηκε και δεν παρατηρήθηκε κάποια σχέση τους με τη δράση του miRNA-638 (52).

## **7 - Παραδείγματα κλινικών δοκιμών miRNAs στον καρκίνο του μαστού**

Η πλειοψηφία των κλινικών δοκιμών (πίνακας 11) στον καρκίνο του μαστού είναι κυρίως δοκιμές παρατήρησης (observational) στα πλαίσια περιγραφής (profiling) της έκφρασης των

κυκλοφορούντων miRNAs, όπως για παράδειγμα του ClinicalTrialsIreland στόχος της οποίας είναι η ταυτοποίηση miRNAs σε ασθενείς που λαμβάνουν επικουρική χημειοθεραπεία (ClinicalTrials.govidentifier: Nbib1722851). Παρομοίως σε άλλη κλινική μελέτη, οι ερευνητές μελετώντας ασθενείς με μεταστατικό ή προχωρημένου σταδίου καρκίνο του μαστού προσπάθησαν να ξεχωρίσουν miRNAs, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ευαισθησίας και αντίστασης του όγκου στην ορμονική θεραπεία (ClinicalTrials.govidentifier: Nbib1612871).

Στον (Πίνακα 10) παρουσιάζονται miRNAs, για τα οποία θα μπορούσε να γίνει μελλοντικά μελέτη με σκοπό την ανάπτυξη κλινικών εφαρμογών για τους πάσχοντες από καρκίνο του μαστού.

Πίνακας 10: miRNAs με πιθανή μελλοντική χρήση σε κλινικές εφαρμογές (Edna Ayerim Mandujano-Tinoco et al, Breast Cancer Research and Treatment, <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4850-7>).

---

<i>BC detection</i>	miR-1246, miR-211, miR-148b-3p, miR-652-3p, miR-10b-5p, miR-155, miR-21, miR-125b, miR-221, miR-365
<i>Classification of subtypes</i>	Let-7, miR-10a, miR-26, miR-342, miR-150, miR-18a/b
<i>TNBC and core basal</i>	miR-155, miR-493, miR-30e, miR-27a
<i>Metastasis</i>	miR-10b, miR-373, miR-21, miR-34a
<i>Histological grade</i>	miR-21, miR-126, miR-155, miR-199a
<i>Chemoresistance</i>	miR-34, miR-17, let-7a, miR-21, miR-205, miR-221, miR-210, miR-125b, miR-7, miR-340
<i>Poor survival</i>	miR-126-5p, miR-1274b, miR-1825, miR-195-5p, miR-20b-5p, miR-454-3p, miR-935p
<i>Therapy</i>	
<i>Proliferative and angiogenic control</i>	miR-21
<i>Antineoplastic sensitivity</i>	miR-21, miR-155, miR-222, miR-29, miR-638, miR-181, miR-487
<i>Metastasis and migration control</i>	miR-30A, miR-720

---

Πίνακας 11: (συνεχίζεται και στην επόμενη σελίδα)(Endocr Relat Cancer. 2017 May; 24(5): R157–R172. )

Trial			
reference	Study type	Sponsor	Trial title
NCT1722851	Observational	Cancer Trials Ireland	Circulating miRNAs: novel breast cancer biomarkers and their use for guiding and monitoring response to chemotherapy
NCT2127073	Interventional	Sheldon Feldman University Medical Center	Pilot study of oxytocin and microRNA identification in NAF, serum, and tissue in women with breast cancer
NCT1957332	Observational	Groningen	Imaging patients for cancer drug selection – metastatic breast cancer (IMPACT-MBC)
NCT1598285	Observational	Spanish Breast Cancer Research Group	A combined GWAS and miRNA for the Identification of bevacizumab response predictors in metastatic breast cancer
NCT1231386	Observational	City of Hope Medical Center	miRNAs profiling of breast cancer in patients undergoing neoadjuvant or adjuvant treatment for locally advanced and inflammatory breast cancer
NCT1612871	Interventional	Institut Claudius Regaud Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University	Circulating miRNAs as biomarkers of hormone sensitivity in breast cancer? Pilot study
NCT2656589	Observational	West Pomeranian Cancer Center	A perspective study of the predictive value of microRNA in patients with HER2 positive advanced stage breast cancer who were treated with herceptin
NCT2065908	Observational	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Circulating microRNAs as a novel biomarker of early cardiotoxicity in breast cancer patients treated with anthracyclines
NCT581750	Observational	Juravinski Cancer Center	Molecular genetic basis of invasive breast cancer risk associated with lobular carcinoma <i>in situ</i>
NCT1965522	Interventional	Hamilton Health Sciences Corporation	Anti-proliferative effects of vitamin D and melatonin in breast cancer (MELO-D)
NCT2288806	Interventional	Georgetown University	Melatonin and vitamin d in breast cancer (MELO-D)
NCT2103140	Interventional		An exercise randomized controlled trial targeting African-American women with metabolic syndrome and high risk for breast cancer

NCT1907438	Observational	Hadassah Medical Organization	Identification of the transformation potential of normal estrogen exposed BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) and BRCA2 (breast cancer susceptibility gene 2) heterozygous epithelial breast cells due to irradiation
NCT773695	Interventional	Hoffmann-La Roche	A multicenter, randomized, ph II clinical trial to evaluate the effect of avastin in combination with neoadj treatment regimens on the molecular and metabolic characteristics and changes in the primary tumors with ref to the obtained responses in patients with large primary HER2 Neg breast cancers
NCT1724450	Interventional	University of Sao Paulo	Carvedilol effect in preventing chemotherapy – induced cardiotoxicity: a randomized double blind study
NCT2437318	Interventional	Novartis Pharmaceuticals	A phase III randomized double-blind, placebo controlled study of alpelisib in combination with fulvestrant for men and postmenopausal women with hormone receptor positive, HER2-negative advanced breast cancer which progressed on or after aromatase inhibitor treatment
NCT1879436	Observational	Meir Medical Center	The effect of human placental explants and pregnant women sera on cancer cells
NCT2678650	Interventional	Capital Medical University	MicroRNA mediates volatile anesthetics preconditioning induced artery protection

## **8 - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Στην παρούσα εργασία, μέσα από την πρόσφατη βιβλιογραφία, αναδείχθηκε ότι σε όλα τα στάδια - ορόσημα της ογκογένεσης στον καρκίνο του μαστού παρατηρείται απορύθμιση είτε της έκφρασης είτε της δραστηριότητας αρκετών miRNAs. Το γεγονός αυτό, σε μοριακό επίπεδο, αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν παθογενετικά τα miRNAs στον καρκίνο του μαστού αλλά και το πλήθος των κλινικών εφαρμογών που εν δυνάμει μπορούν μελλοντικά να αναπτυχθούν είτε για διαγνωστικούς είτε ακόμη για θεραπευτικούς λόγους στον καρκίνο του μαστού.

Ανάλογη είναι η εικόνα, βάσει της τρέχουσας βιβλιογραφίας, στον χώρο των exo-miRNAs στον καρκίνο του μαστού. Αρκετές ερευνητικές ομάδες παγκοσμίως έχουν δείξει ότι τα exo-

miRNAs δεν μπορούν να αποτελέσουν μόνο πιθανούς βιοδείκτες για τον καρκίνο του μαστού αλλά και χρήσιμα θεραπευτικά εργαλεία στην καθημερινή κλινική πρακτική. Το ανωτέρω γεγονός υποστηρίζεται από μελέτες στις οποίες φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα κυκλοφορούντα exo-miRNAs στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ρυθμίζουν είτε το βαθμό ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων στη χορήγηση χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων (πχ. exo-miR-29a και exo-miR-222) είτε επηρεάζουν το μεταστατικό/διηθητικό δυναμικό ή αδράνεια των καρκινικών κυττάρων (πχ. exo-miR-222/223, exo-miR-23b, exo-miR-21, exo-miR-23a/b).

Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί αρκετά πάνελ κυκλοφορούντων miRNAs από ερευνητικές ομάδες παγκοσμίως στην κατεύθυνση ανάδειξης miRNAs ως βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού ή ως επικουρικά θεραπευτικά εργαλεία σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά σκευάσματα (πχ πλατίνα ή PARP-1 παρεμποδιστές). Όμως ακόμη οι μελέτες δεν έχουν καταλήξει σε κάποιο πάνελ miRNAs το οποίο θα μπορούσε με αξιοπιστία να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Υπάρχουν πολλά ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπισθούν, όπως τα μικρά δείγματα ασθενών, η φτωχή συχνά στατιστική ανάλυση, οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται μεταξύ μελετών στην επιλογή τόσο των ασθενών όσο και των τεχνικών απομόνωσης-μέτρησης των κυκλοφορούντων miRNAs και ο περιορισμένος αριθμός επιβεβαιωτικών-μελετών (validation studies) .

Παρακάτω συνοψίζουμε τα αποτελέσματα σημαντικών μελετών των τελευταίων ετών:

- 1) ο διαφορετικός βαθμός έκφρασης του miR-195 στον καρκίνο του μαστού και αντίστοιχα του miR-214 μεταξύ καλοήθων και κακοήθων νοσημάτων του μαστικού αδένα (Heneghan και συν.)
- 2) η σημαντική αύξηση της έκφρασης των miR-505-5p, miR-125-5p, miR-21-5p, miR-96-5p και μείωση της έκφρασης του let-7c (Matamala και συν.)(Li και συν.).
- 3) Η αυξημένη έκφραση και συσχέτιση της έκφρασης τους με το στάδιο της νόσου (κατόπιν μελέτης global expression profiling) των miR-4270, miR-1225-5p, miR-188-5p, miR-1202, miR-4281, miR-1207-5p, miR-642-3p, miR-1290 και miR-3141 (Hamam και συν.).
- 4) Η μεταβολή των επιπέδων του miR-155 ως δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία (Sun και συν.)
- 5) Η δράση του miR-9 σε πειραματικό επίπεδο (ποντίκια-πειραματόζωα) που σε συνδυασμό με τη χορήγηση PARP-1 παρεμποδιστών συνέβαλε στη μείωση της ανάπτυξης του όγκου (έχει επίσης συνδεθεί με μείωση της έκφρασης του γονιδίου BRCA1).

Τέλος, όσον αφορά στη κλινική εφαρμογή των miRNAs στον καρκίνο του μαστού, είναι καταγεγραμμένες στη USNationalLibraryofMedicine - [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). 3 κλινικές δοκιμές οι οποίες αφορούν στη χρήση των miRNAs για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού και βρίσκονται και οι δύο στη φάση συλλογής ασθενών.

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- 1.Εγχειρίδιο ανατομικής του ανθρώπου με έγχρωμο άτλαντα σελ 320-321, W. Kahle -H. Leonhardt - W. Platzer.
2. Εγχειρίδιο ιστολογίας, κεφάλαιο 17 σελ. 339-344, LeslieP. Gartner - JamesL. Hiatt

3. Wheater's Functional Histology, The Breast σελ.378-381, Barbara Young - Geraldine o'Dowd - Phillip Woodford.
4. Εγχειρίδιο Φυσιολογίας Κεφ.11 Ορμόνες και αναπαραγωγή σελ 303-305 Stefan Silbernagl - Agamemnon Despotopoulos.
5. Flora Zagouri, Theodoros N. Sergentanis, Alexandra Tsigginou, Constantine Dimitrakakis,<sup>3</sup>George C. Zografos,<sup>4</sup>Meletios-Athanassios Dimopoulos, and Theodora Psaltopoulou J Thorac Dis. 2014 Jun; 6(6): 589–590.
6. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science. 1994;266:66–71.
7. Stratton MR, Ford D, Neuhasen S, Seal S, Wooster R, et al. Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. Nat Genet. 1994;7:103–107.
8. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, et al. Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, BRCA2, to Chromosome 13q12-13. Science. 1994;265:2088–2090.
9. Albertsen H, Plaetke R, Ballard L, Fujimoto E, Connolly J, et al. Genetic mapping of the BRCA1 region on chromosome 17q21. Am J Hum Genet. 1994;54:516–525.
10. Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S, et al. A Collaborative Survey of 80 Mutations in the BRCA1 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene Implications for Presymptomatic Testing and Screening. JAMA. 1995;273:535–541.
11. Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. Genet Med. 2010;12:245–259.
12. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1 mutation carriers. Lancet. 1994;343:692–695.
13. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature. 1995;378:789–792.
14. Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 1999;91:1310–1316.56. Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, Lindor NM, McDonnell SK, et al. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. Ann Intern Med. 1998;128:896–899.
15. Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, et al. Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, Cowden disease, and juvenile polyposis. Am J Hum Genet. 1997;61:1254–1260.
16. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr, Nelson CE, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science. 1990;250:1233–1238.
17. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. Nat Genet. 2006;38:873–875.
18. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, et al. e1C in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. Nat Genet. 1100d;31:55–59.
19. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. N Engl J Med. 2014;371:497–506.
20. Kolinjivadi AM, Sannino V, de Antoni A, Técher H, Baldi G, et al. Moonlighting at replication forks: a new life for homologous recombination proteins BRCA1, BRCA2 and RAD51. FEBS Lett 2017
21. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, et al. A study of over 35000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. Cancer 2017
22. Couch FJ, Kuchenbaecker KB, Michailidou K, Mendoza-Fandino GA, Nord S, et al. Identification of four novel susceptibility loci for oestrogen receptor negative breast cancer. Nat Commun. 2016;7:11375.
23. Tomczak K, Czerwinska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. Contemp Oncol (Pozn) 2015;19:A68–77.



24. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 2007;447:1087–1093.
25. Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, et al. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet*. 2008;82:937–948.
26. Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, Yeager M, Wacholder S, et al. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1) *Nat Genet*. 2009;41:579–584.
27. Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J, et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet*. 2013;45:353–361, 361e1-2.56.
28. Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, Lindor NM, McDonnell SK, et al. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med*. 1998;128:896–899.(344) Dotto J, Kluk M, Geramizadeh B, Tavassoli FA: Frequency of clinically occult intraepithelial and invasive neoplasia in reduction mammoplasty specimens: a study of 516 cases. *Int J Surg Pathol*. 16:25-30 2008 [18203780](#)
29. Kluzek K, Białkowska A, Koczorowska A. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in BRCA1/2 cancer therapy. *Postepy Hig Med Dosw*. 2012;66:372–384. doi: 10.5604/17322693.1000548.
30. Konecny GE, Kristeleit RS. PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions. *Br J Cancer*. 2016;115:1157–1173. doi: 10.1038/bjc.2016.311.
31. Vos S, Vesuna F, Raman V, van Diest PJ, van der Groep P. miRNA expression patterns in normal breast tissue and invasive breast cancers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers. *Oncotarget*. 6:31.
32. Behrendt K, Suwiński R, Grzybowska E, Zientek H, Rogozińska-Szczepka J, Utracka-Hutka B, Nowicka E, Lange D. Clinical course of breast cancer in carriers of BRCA1 germline mutations. *Współczesna Onkologia*. 2003;7(10):742–53.
33. Benafif S, Hall M. An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2015;8:519–528.
34. Berhuck A, Heron K, Carney ME, Lancaster JM, Fraser EG, Vinson VL, Deffenbaugh AM, Miron A, Marks JR, Futreal PA, Frank TS. Frequency of germline and somatic BRCA1 mutations in ovarian cancer. *Clin Caner Res*. 1998;4:2433–7.
35. Knudson A. Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Semin Oncol*. 1978;5:57–60.
36. Mueller C, Calvin D Roskelley, regulation of *BRCA1* expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2003;5(1):45–52. doi: 10.1186/bcr557.
37. Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Arias JI, Menéndez P, Andrés-León E, Yanowsky K, Llana-Folgueras A, Miñambres R, Martínez-Delgado B, Benítez J, MicroRNA deregulation in triple negative breast cancer reveals a role of miR-498 in regulating BRCA1 expression. *Oncotarget*. 7(15):20068–79.
38. Turner NC, Tutt ANJ. Platinum chemotherapy for BRCA-1 related breast cancer: do we need more evidence? *Breast Cancer Res*. 2012;14:115. doi: 10.1186/bcr3332.
39. Tchounwou PB, Dasari S. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;0:364–78.
40. Byrski T, Dent R, Blecharz P, Foszczynska-Kloda M, Gronwald J, Huzarski T, et al. Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with BRCA1-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012;14(4):R110. <https://doi.org/10.1186/bcr3231>.
41. Nowsheen S, Yang ES. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp Oncol*. 2012;34(3):243–54.

42. Budzyński M, Grenda A, Filip A. MicroRNA molecule as an important component of the mechanisms regulating the expression of genes associated with cancer. 2014;64(1):48–60.
43. <http://ecancer.org/news/6786-olaparib-approved-in-the-eu-as-treatment-for-advanced-bcra-mutated-ovarian-cancer.php>.
44. Sun C, Li N, Yang Z, Zhou B, He Y, Weng D, Fang Y, Wu P, Chen P, Yang X, Ma D, Zhou J, Chen G. miR-9 Regulation of BRCA1 and Ovarian Cancer Sensitivity to Cisplatin and PARP Inhibition. *JNCI*. 2013;105(22).
45. Gu Y, Zhang M, Peng F, Fang L, Zhang Y, Liang H, Zhou W, Ao L, Guo Z. The BRCA1/2-directed miRNA signature predicts a good prognosis in ovarian cancer patients with wild-type BRCA1/2. *Oncotarget*. 6(4):2397–406.
46. Suhwan Ch, Sharan SK. BRCA1 and MicroRNA's: Emerging Networks nad potential therapeutic targets. *Mol Cells*. 2012;34:425–32. doi: 10.1007/s10059-012-0118-y.
47. Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, Beech J, Kulshrestha R, Abdelmohsen K, Weinstock DM, Gorospe M, Harris AL, Helleday T, Chowdhury D. miR-182-mediated down-regulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell*. 2011;41(2):210–220. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.005.
48. Kahlert C, Klupp F, Brand K, Lasitschka F, Diederichs S, Kirchberg J, Rahbari N, Dutta S, Bork U, Fritzmann J, Reissfelder C, Koch M, Weitz J. Invasion front-specific expression and prognostic significance of microRNA in colorectal liver metastases. *Cancer Sci*. 2011;102:1799–1807. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02023.x.
49. He X, Xiao X, Dong L, Wan N, Zhou Z, Deng H, Zhang X. MiR-218 regulates cisplatin chemosensitivity in breast cancer by targeting BRCA1. *Tumor Biol*. 2015;36:2065–2075. doi: 10.1007/s13277-014-2814-z.
50. Zavala V, Pérez-Moreno E, Tapia T, Camus M, Carvallo P. miR-146a and miR-638 in BRCA1-deficient triple negative breast cancer tumors, as potential biomarkers for improved overall survival. *Cancer Biomarkers*. 2016;16:99–107. doi: 10.3233/CBM-150545.
51. Zhang X, Wei J, Zhou L, Zhou C, Shi J, Yuan Q, Yang M, Lin D. A functional BRCA1 coding sequence genetic variant contributes to risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2013;34:2309–2313. doi: 10.1093/carcin/bgt213.
52. Tan X, Peng J, Fu Y, An S, Rezaei K, Tabbara S, Teal CB, Man Y, Brem RF, Fu SW. miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer, Tan et al. *Breast Cancer Res*. 2014;16:435.
53. Lustberg MB, Ramaswamy B. Epigenetic therapy in breast cancer. *Curr Breast Cancer Rep* 2011;3:34–43.
54. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:5462–82.
55. Parrella P. Epigenetic signatures in breast cancer: clinical perspective. *Breast Care (Basel)* 2010;5:66–73.
56. Vincent-Salomon A, Thiery JP. Host microenvir- onment in breast cancer development: epithelial- mesenchymal transition in breast cancer develop- ment. *Breast Cancer Res* 2003;5:101–6.
57. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in develop- ment and disease. *Cell* 2009;139:871–90.
58. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med* 2013;19:1438–49.
59. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 2013;342:1234850.
60. Lopez J, Percharde M, Coley HM, et al. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer* 2009;100:571–7.
61. Stefansson OA, Villanueva A, Vidal A, et al. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemot herapy in breast and ovarian cancer. *Epigenetics* 2012;7:1225–9.

62. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148–59.
30. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415–28.
63. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5427–40.
64. Radpour R, Barekati Z, Kohler C, et al. Integrated epigenetics of human breast cancer: synoptic investigation of targeted genes, microRNAs and proteins upon demethylation treatment. *PLoS One* 2011;6:e27355.
65. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010;28:1057–68.
66. Chik F, Szyf M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. *Carcinogenesis* 2011;32:224–32.
67. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6:107–16.
68. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286–98.
69. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128:683–92.
70. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002;21:5400–13.
71. Richardson BC. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr* 2002;132:2401S–5S.
72. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003;300:455.
73. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004;4:143–53.
75. Hoque MO, Prencipe M, Poeta ML, et al. Changes in CpG islands promoter methylation patterns during ductal breast carcinoma progression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:2694–700.
76. Gheibi A, Kazemi M, Baradaran A, et al. Study of promoter methylation pattern of 14-3-3 sigma gene in normal and cancerous tissue of breast: a potential biomarker for detection of breast cancer in patients. *Adv Biomed Res* 2012;1:80.
77. Park SY, Seo AN, Jung HY, et al. Alu and LINE-1 Hypomethylation Is Associated with HER2 Enriched Subtype of Breast Cancer. *PLoS One* 2014;9:e100429.
78. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539–48.
79. Nowshien S, Aziz K, Tran PT, et al. Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. *Cancer Lett* 2014;342:213–22.
80. Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999;98:285–94.
81. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128:693–705.
82. Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2725–8.
83. Razin A, Szyf M. DNA methylation patterns. Formation and function. *Biochim Biophys Acta* 1984;782:331–42.
84. Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, et al. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 1999;13:1924–35.
85. Rauch TA, Wu X, Zhong X, et al. A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:671–8.
86. Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, et al. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:7025–9.

87. Dworkin AM, Huang TH, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol* 2009;19:165–71.
88. Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, et al. Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:1045–51.
89. Susman S, Tomuleasa C, Fekete Z, et al. The importance of microRNAs in the stroma-breast cancer cell interplay. *Cancer Biomark* 2014;14:137–44.
90. Lin HJ, Zuo T, Lin CH, et al. Breast cancer-associated fibroblasts confer AKT1-mediated epigenetic silencing of Cystatin M in epithelial cells. *Cancer Res* 2008;68:10257–66.
91. Brentnall TA, Lai LA, Coleman J, et al. Arousal of cancer-associated stroma: overexpression of palladin activates fibroblasts to promote tumor invasion. *PLoS One* 2012;7:e30219.
92. Dedeurwaerder S, Desmedt C, Calonne E, et al. DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers. *EMBO Mol Med* 2011;3:726–41.
93. Dedeurwaerder S, Fuks F. DNA methylation markers for breast cancer prognosis: unmasking the immune component. *Oncoimmunology* 2012;1:962–4.
94. Tse GM, Tan PH, Lau KM, de Andrade VP, Lui PC, Vong JS, Chaiwun B, Lam CC, Yu AM, Moriya T: Breast cancer in the elderly: a histological assessment. *Histopathology*. 55:441-451 2009
95. Garfinkel L, Boring CC, Heath CW Jr: Changing trends. An overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer*. 74:222-227 1994
96. Jatoi I, Miller AB: Why is breast-cancer mortality declining?. *Lancet Oncol*. 4:251-254 2003
97. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS: Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 37:S4-66 2001
98. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Estimating the world cancer burden. *Globocan 2000*. *Int J Cancer*. 94:153-156 2001
99. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V: UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20–69 years. *Lancet*. 355:1822 2000
100. Sondik EJ: Breast cancer trends. Incidence, mortality, and survival. *Cancer*. 74:995-999 1994
101. Carter DJ, Rosen PP: Atypical apocrine metaplasia in sclerosing lesions of the breast. A study of 51 patients. *Mod Pathol*. 4:1-5 1991
102. Armstrong K, Eisen A, Weber B: Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 342:564-571 2000
103. Berkel H, Birdsall DC, Jenkins H: Breast augmentation. A risk factor for breast cancer?. *N Engl J Med*. 326:1649-1653 1992
104. Bryant H, Brasher P: Breast implants and breast cancer. Reanalysis of a linkage study. *N Engl J Med*. 332:1535-1539 1995
105. Chen CL, Weiss NS, Newcomb P, Barlow W, White E: Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. *JAMA*. 287:734-741 2002
106. Clemons M, Goss P: Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 344:276-285 2001
107. Goss PE, Sierra S: Current perspectives on radiation-induced breast cancer. *J Clin Oncol*. 16:338-347 1998
108. Hildreth NG, Shore RE, Hempelmann LH: Risk of breast cancer among women receiving radiation treatment in infancy for thymic enlargement. *Lancet*. 2:273 1983
109. Hoover R, Gray LA Sr, Cole P, MacMahon B: Menopausal estrogens and breast cancer. *N Engl J Med*. 295:401-405 1976

110. IARC Hormonal contraception and post-menopausal hormonal therapy. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. vol. 72 1998 IARC Press Lyon
111. Kelsey JL, Gammon MD, John EM: Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 15:36-47 1993
112. Moore DH, Moore DH II, Moore CT: Breast carcinoma etiological factors. *Adv Cancer Res.* 40:189-253 1983
113. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW, Burke KP, Willett WC, MacMahon B: Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med.* 330:81-87 1994
114. Pathak DR, Osuch JR, He J: Breast carcinoma etiology: current knowledge and new insight into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations. *Cancer.* 88:1230-1238 2000
115. Romieu I, Berlin JA, Colditz G: Oral contraceptives and breast cancer. Review and meta-analysis. *Cancer.* 66:2253-2263 1990
116. Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC: Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst.* 92:328-332 2000
117. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R: Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA.* 283:485-491 2000
118. Schrager CA, Schneider D, Gruener AC, Tsou HC, Peacocke M: Clinical and pathological features of breast disease in Cowden's syndrome: an underrecognized syndrome with an increased risk of breast cancer. *Hum Pathol.* 29:47-53 1998
119. Shore RE, Hempelmann LH, Kowaluk E, Mansur PS, Pasternack BS, Albert RE, Haughie GE: Breast neoplasms in women treated with x-rays for acute postpartum mastitis. *J Natl Cancer Inst.* 59:813-822 1977
120. Simon N, Silverstone SM: Radiation as a cause of breast cancer. *Bull N Y Acad Sci.* 52:741-751 1976
121. Skolnick MH, Cannon-Albright LA: Genetic predisposition to breast cancer. *Cancer.* 70:1747-1754 1992
122. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL: Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med.* 325:1831-1836 1991
123. Wang DY, Rubens RD, Allen DS, Millis RR, Bulbrook RD, Chaudary MA, Hayward JL: Influence of reproductive history of age at diagnosis of breast cancer and prognosis. *Int J Cancer.* 36:427-432 1985
124. Anglian Breast Cancer Study Group: Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. *Br J Cancer.* 83:1301-1308 2000
125. Blackwood MA, Weber BL: BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol.* 16:1969-1977 1998
126. Da Silva L, Lakhani SR: Pathology of hereditary breast cancer. *Mod Pathol.* 23 (Suppl 2):S46-S51 2010
127. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, Eddington K, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Ding W, Gholami Z, Söderkvist P, Terry L, Jhanwar S, Berchuck A, Iglehart JD,

- Marks J, Ballinger DG, Barrett JC, Skolnick MH, Kamb A, Wiseman R: BRCA 1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*. 266:120-122 1994
128. Lee WY, Jin YT, Chang TW, Lin PW, Su IJ: Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology*. 34:106-112 1999
129. Narod SA, Foulkes WD: BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 4:665-676 2004
130. Palacios J, Robles-Frias MJ, Castilla MA, Lopez-Garcia MA, Benitez J: The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology*. 75:85-94 2008
131. Ponder B: Breast cancer genes. Searches begin and end [editorial]. *Nature*. 371:279 1994
132. Robson M, Offit K: Management of an inherited predisposition to breast cancer. *N Engl J Med*. 357:154-162 2007
133. Robson M, Svahn T, McCormick B, Borgen P, Hudis CA, Norton L, Offit K: Appropriateness of breast-conserving treatment of breast carcinoma in women with germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a clinic-based series. *Cancer*. 103:44-51 2005
134. Ruffner H, Verma IM: BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:7138-7143 1997
135. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA: The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 336:1401-1408 1997
136. Tan DS, Marchio C, Reis-Filho JS: Hereditary breast cancer: from molecular pathology to tailored therapies. *J Clin Pathol*. 61:1073-1082 2008
137. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, Fields P, Marshall G, Narod S, Lenoir GM, Lynch H, Feunteun J, Devilee P, Cornelisse CJ, Menko FH, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Pye C, Lewis CM, Cannon-Albright LA, Peto J, Ponder BAJ, Skolnick MH, Easton DF, Goldgar DE, Stratton MR: Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 265:2088-2090 1994
138. Wooster R, Weber BL: Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med*. 348:2339-2347 2003
139. Tulinius H, Sigvaldason H, Olafsdottir G: Left and right sided breast cancer. *Pathol Res Pract*. 186:92-94 1990
140. Broët P, de la Rochefordière A, Scholl SM, Fourquet A, Massen V, Durand J-C, Pouillart P, Asselain B: Contralateral breast cancer. Annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol*. 13:1578-1583 1995
141. Dawson PJ: What is new in our understanding of multifocal breast cancer. *Pathol Res Pract*. 189:111-116 1993
142. Heron DE, Komarnicky LT, Hyslop T, Schwartz GF, Mansfield CM: Bilateral breast carcinoma: risk factors and outcomes for patients with synchronous and metachronous disease. *Cancer*. 88:2739-2750 2000
143. American College of Radiology: Breast imaging reporting and data system (BI-RADS). ed. 3 1998 American College of Radiology Reston, VA
144. Charpin C, Bonnier P, Khouzami A, Andrac L, Habib M, Vacheret H, Lavaut MN, Piana L: Non palpable breast carcinomas. Histological and immunohistochemical studies of 160 cases. *Pathol Res Pract*. 189:267-274 1993
145. McDivitt RW: Breast carcinoma. *Hum Pathol*. 9:3-21 1978

146. Millis RR, Davis R, Stacey AJ: The detection and significance of calcification in the breasts. A radiological and pathological study. *Br J Radiol.* 49:12-26 1976
147. US Preventive Services Task Force: Screening for breast cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 151:716-726 2009
148. Arisio R, Cuccorese C, Accinelli G, Mano MP, Bordon R, Fessia L: Role of fine-needle aspiration biopsy in breast lesions: analysis of a series of 4,110 cases. *Diagn Cytopathol.* 18:462-467 1998
149. Barrows GH, Anderson TJ, Lamb JL, Dixon JM: Fine-needle aspiration of breast cancer. Relationship of clinical factors to cytology results in 689 primary malignancies. *Cancer.* 58:1493-1498 1986
150. Dawson AE, Mulford DK, Sheils LA: The cytopathology of proliferative breast disease. *Am J Clin Pathol.* 103:438-442 1995
151. Eisenberg AJ, Hajdu SI, Wilhelmus J, Melamed MR, Kinne D: Preoperative aspiration cytology of breast tumors. *Acta Cytol (Baltimore).* 30:135-146 1986
152. Kline TS, Joshi LP, Neal HS: Fine-needle aspiration of the breast. Diagnoses and pitfalls. A review of 3545 cases. *Cancer.* 44:1458-1464 1979
153. Thomas PA, Vazquez MF, Waisman J: Comparison of fine-needle aspiration and frozen section of palpable mammary lesions. *Mod Pathol.* 3:570-574 1990
154. Wanebo HJ, Feldman PS, Wilhelm MC, Covell JL, Binns RL: Fine needle aspiration cytology in lieu of open biopsy in management of primary breast cancer. *Ann Surg.* 199:569-578 1984
155. Davies JD, Nonni A, D'Costa HF: Mammary epidermoid inclusion cysts after wide-core needle biopsies. *Histopathology.* 31:549-551 1997
156. Gobbi H, Tse G, Page DL, Olson SJ, Jensen RA, Simpson JF: Reactive spindle cell nodules of the breast after core biopsy or fine needle aspiration. *Am J Clin Pathol.* 113:288-294 2000
157. Koo JS, Jung WH, Kim H: Epithelial displacement into the lymphovascular space can be seen in breast core needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 133:781-787 2010
158. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, 136, E359–E386.
159. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, 67, 7–30.
160. Kalluri, R. The biology and function of exosomes in cancer. *J. Clin. Investig.* **2016**, 126, 1208–1215.
161. Thind, A.; Wilson, C. Exosomal mirnas as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J. Extracell. Vesicles* **2016**, 5, 31292
162. Joyce, D.P.; Kerin, M.J.; Dwyer, R.M. Exosome-encapsulated micrornas as circulating biomarkers for breast cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, 139, 1443–1448.
163. Graveel, C.R.; Calderone, H.M.; Westerhuis, J.J.; Winn, M.E.; Sempere, L.F. Critical analysis of the potential for microrna biomarkers in breast cancer management. *Breast Cancer (Dove Med Press)* **2015**, 7, 59–79.
164. Pencheva, N.; Tavazoie, S.F. Control of metastatic progression by microrna regulatory networks. *Nat. Cell Biol.* **2013**, 15, 546–554.
165. Nedaeinia, R.; Manian, M.; Jazayeri, M.H.; Ranjbar, M.; Salehi, R.; Sharifi, M.; Mohaghegh, F.; Goli, M.; Jahednia, S.H.; Avan, A.; et al. Circulating exosomes and exosomal micrornas as biomarkers in gastrointestinal cancer. *Cancer Gene Ther.* **2017**, 24, 48–56.



166. Pigati, L.; Yaddanapudi, S.C.; Iyengar, R.; Kim, D.J.; Hearn, S.A.; Danforth, D.; Hastings, M.L.; Duelli, D.M. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13515.
167. Palma, J.; Yaddanapudi, S.C.; Pigati, L.; Havens, M.A.; Jeong, S.; Weiner, G.A.; Weimer, K.M.; Stern, B.; Hastings, M.L.; Duelli, D.M. MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 9125–9138.
168. Jenjaroenpun, P.; Kremenska, Y.; Nair, V.M.; Kremenskoy, M.; Joseph, B.; Kurochkin, I.V. Characterization of rna in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. *PeerJ* **2013**, *1*, e201.
169. Eichelser, C.; Stuckrath, I.; Muller, V.; Milde-Langosch, K.; Wikman, H.; Pantel, K.; Schwarzenbach, H. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget* **2014**, *5*, 9650–9663.
170. Hannafon, B.N.; Trigos, Y.D.; Calloway, C.L.; Zhao, Y.D.; Lum, D.H.; Welm, A.L.; Zhao, Z.J.; Blick, K.E.; Dooley, W.C.; Ding, W.Q. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2016**, *18*, 90.
171. Shimomura, A.; Shiino, S.; Kawauchi, J.; Takizawa, S.; Sakamoto, H.; Matsuzaki, J.; Ono, M.; Takeshita, F.; Niida, S.; Shimizu, C.; et al. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 326–334.
172. Fu, L.; Li, Z.; Zhu, J.; Wang, P.; Fan, G.; Dai, Y.; Zheng, Z.; Liu, Y. Serum expression levels of microRNA-382-3p, -598-3p, -1246 and -184 in breast cancer patients. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 269–274.
173. Li, S.; Yang, X.; Yang, J.; Zhen, J.; Zhang, D. Serum microRNA-21 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Med.* **2016**, *16*, 29–35.
174. Zhong, S.; Chen, X.; Wang, D.; Zhang, X.; Shen, H.; Yang, S.; Lv, M.; Tang, J.; Zhao, J. MicroRNA expression profiles of drug-resistance breast cancer cells and their exosomes. *Oncotarget* **2016**, *7*, 19601–19609.
175. Mihelich, B.L.; Dambal, S.; Lin, S.; Nonn, L. miR-182, of the miR-183 cluster family, is packaged in exosomes and is detected in human exosomes from serum, breast cells and prostate cells. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 1197–1203.
176. Wei, Z.; Batagov, A.O.; Carter, D.R.; Krichevsky, A.M. Fetal bovine serum rna interferes with the cell culture derived extracellular rna. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31175.
177. Bovy, N.; Blomme, B.; Freres, P.; Dederen, S.; Nivelles, O.; Lion, M.; Carnet, O.; Martial, J.A.; Noel, A.; Thiry, M.; et al. Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 10253–10266.
178. Wei, Y.; Lai, X.; Yu, S.; Chen, S.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Li, H.; Zhu, X.; Yao, L.; Zhang, J. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient er positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *147*, 423–431.
179. Chen, W.X.; Liu, X.M.; Lv, M.M.; Chen, L.; Zhao, J.H.; Zhong, S.L.; Ji, M.H.; Hu, Q.; Luo, Z.; Wu, J.Z.; et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95240.
180. Zhong, S.; Li, W.; Chen, Z.; Xu, J.; Zhao, J. miR-222 and miR-29a contribute to the drug-resistance of breast cancer cells. *Gene* **2013**, *531*, 8–14.
181. Shen, H.; Li, L.; Yang, S.; Wang, D.; Zhong, S.; Zhao, J.; Tang, J. MicroRNA-29a contributes to drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin through pten/akt/gsk3beta signaling pathway. *Gene* **2016**, *593*, 84–90.
182. Shen, H.; Wang, D.; Li, L.; Yang, S.; Chen, X.; Zhou, S.; Zhong, S.; Zhao, J.; Tang, J. Mir-222 promotes drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin via modulation of pten/akt/foxo1 pathway. *Gene* **2017**, *596*, 110–118.
183. Yu, D.D.; Wu, Y.; Zhang, X.H.; Lv, M.M.; Chen, W.X.; Chen, X.; Yang, S.J.; Shen, H.; Zhong, S.L.; Tang, J.H.; et al. Exosomes from adriamycin-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-222. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 3227–3235.

184. Wei, Y.; Li, M.; Cui, S.; Wang, D.; Zhang, C.Y.; Zen, K.; Li, L. Shikonin inhibits the proliferation of human breast cancer cells by reducing tumor-derived exosomes. *Molecules* **2016**, *21*.
185. Donnarumma, E.; Fiore, D.; Nappa, M.; Roscigno, G.; Adamo, A.; Iaboni, M.; Russo, V.; Affinito, A.; Puoti, I.; Quintavalle, C.; et al. Cancer-associated fibroblasts release exosomal micrnas that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 19592–19608.
186. Gernapudi, R.; Yao, Y.; Zhang, Y.; Wolfson, B.; Roy, S.; Duru, N.; Eades, G.; Yang, P.; Zhou, Q. Targeting exosomes from preadipocytes inhibits preadipocyte to cancer stem cell signaling in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *150*, 685–695.
187. O'Brien, K.; Lowry, M.C.; Corcoran, C.; Martinez, V.G.; Daly, M.; Rani, S.; Gallagher, W.M.; Radomski, M.W.; MacLeod, R.A.; O'Driscoll, L. Mir-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity. *Oncotarget* **2015**, *6*, 32774–32789.
188. Singh, R.; Pochampally, R.; Watabe, K.; Lu, Z.; Mo, Y.Y. Exosome-mediated transfer of mir-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 256.
189. Le, M.T.; Hamar, P.; Guo, C.; Basar, E.; Perdigo-Henriques, R.; Balaj, L.; Lieberman, J. Mir-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 5109–5128.
190. Baroni, S.; Romero-Cordoba, S.; Plantamura, I.; Dugo, M.; D'Ippolito, E.; Cataldo, A.; Cosentino, G.; Angeloni, V.; Rossini, A.; Daidone, M.G.; et al. Exosome-mediated delivery of mir-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2312.
191. Fong, M.Y.; Zhou, W.; Liu, L.; Alontaga, A.Y.; Chandra, M.; Ashby, J.; Chow, A.; O'Connor, S.T.; Li, S.; Chin, A.R.; et al. Breast-cancer-secreted mir-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 183–194.
192. Zhou, W.; Fong, M.Y.; Min, Y.; Somlo, G.; Liu, L.; Palomares, M.R.; Yu, Y.; Chow, A.; O'Connor, S.T.; Chin, A.R.; et al. Cancer-secreted mir-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 501–515.
193. Tominaga, N.; Kosaka, N.; Ono, M.; Katsuda, T.; Yoshioka, Y.; Tamura, K.; Lotvall, J.; Nakagama, H.; Ochiya, T. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6716.
194. Hannafon, B.N.; Carpenter, K.J.; Berry, W.L.; Janknecht, R.; Dooley, W.C.; Ding, W.Q. Exosome-mediated microrna signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). *Mol. Cancer* **2015**, *14*, 133.
195. Ono, M.; Kosaka, N.; Tominaga, N.; Yoshioka, Y.; Takeshita, F.; Takahashi, R.U.; Yoshida, M.; Tsuda, H.; Tamura, K.; Ochiya, T. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microrna that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal.* **2014**, *7*, ra63.
196. Lim, P.K.; Bliss, S.A.; Patel, S.A.; Taborga, M.; Dave, M.A.; Gregory, L.A.; Greco, S.J.; Bryan, M.; Patel, P.S.; Rameshwar, P. Gap junction-mediated import of microrna from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1550–1560.
197. Bliss, S.A.; Sinha, G.; Sandiford, O.A.; Williams, L.M.; Engelberth, D.J.; Guirao, K.; Isenalumhe, L.L.; Greco, S.J.; Ayer, S.; Bryan, M.; et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 5832–5844.
198. Guire, V.; Fabbri, M.; Tsongalis, G.J. Not all good things come in big packages. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2017**, *55*, 605–607.
199. Ostfeld, M.S.; Jensen, S.G.; Jeppesen, D.K.; Christensen, L.L.; Thorsen, S.B.; Stenvang, J.; Hvam, M.L.; Thomsen, A.; Mouritzen, P.; Rasmussen, M.H.; et al. Mirna profiling of circulating epcam(+) extracellular vesicles: Promising biomarkers of colorectal cancer. *J. Extracell. Vesicles* **2016**, *5*, 31488.

200. Rupp, A.K.; Rupp, C.; Keller, S.; Brase, J.C.; Eehalt, R.; Fogel, M.; Moldenhauer, G.; Marme, F.; Sultmann, H.; Altevogt, P. Loss of epcam expression in breast cancer derived serum exosomes: Role of proteolytic cleavage. *Gynecol. Oncol.* **2011**, *122*, 437–446.
201. Fabbri, M.; Paone, A.; Calore, F.; Galli, R.; Gaudio, E.; Santhanam, R.; Lovat, F.; Fadda, P.; Mao, C.; Nuovo, G.J.; et al. Micrnas bind to toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E2110–E2116.
202. Challagundla, K.B.; Wise, P.M.; Neviani, P.; Chava, H.; Murtadha, M.; Xu, T.; Kennedy, R.; Ivan, C.; Zhang, X.; Vannini, I.; et al. Exosome-mediated transfer of micrnas within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*.
203. Fabbri, M. Tlrs as mirna receptors. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 6333–6337.
204. Corcoran, C.; Friel, A.M.; Duffy, M.J.; Crown, J.; O'Driscoll, L. Intracellular and extracellular micrnas in breast cancer. *Clin. Chem.* **2011**, *57*, 18–32.
205. Melo, S.A.; Sugimoto, H.; O'Connell, J.T.; Kato, N.; Villanueva, A.; Vidal, A.; Qiu, L.; Vitkin, E.; Perelman, L.T.; Melo, C.A.; et al. Cancer exosomes perform cell-independent micrna biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 707–721.
206. Alamolhodaei, N.S.; Behravan, J.; Mosaffa, F.; Karimi, G. Mir 221/222 as new players in tamoxifen resistance. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 6946–6955.
207. Egeland, N.G.; Lunde, S.; Jonsdottir, K.; Lende, T.H.; Cronin-Fenton, D.; Gilje, B.; Janssen, E.A.; Soiland, H. The role of micrnas as predictors of response to tamoxifen treatment in breast cancer patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 24243–24275.
208. Santos, J.C.; Ribeiro, M.L.; Sarian, L.O.; Ortega, M.M.; Derchain, S.F. Exosomes-mediate micrnas transfer in breast cancer chemoresistance regulation. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 2129–2139.
209. Yu, S.; Wei, Y.; Xu, Y.; Zhang, Y.; Li, J.; Zhang, J. Extracellular vesicles in breast cancer drug resistance and their clinical application. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 2849–2861.
210. Chen, W.X.; Cai, Y.Q.; Lv, M.M.; Chen, L.; Zhong, S.L.; Ma, T.F.; Zhao, J.H.; Tang, J.H. Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering micrnas. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 9649–9659.
211. Fischer, K.R.; Durrans, A.; Lee, S.; Sheng, J.; Li, F.; Wong, S.T.; Choi, H.; El Rayes, T.; Ryu, S.; Troeger, J.; et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* **2015**, *527*, 472–476.
212. Ma, L.; Reinhardt, F.; Pan, E.; Soutschek, J.; Bhat, B.; Marcusson, E.G.; Teruya-Feldstein, J.; Bell, G.W.; Weinberg, R.A. Therapeutic silencing of mir-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 341–347.
213. Di Leva G, Piovan C, Gasparini P, Ngankeu A, Taccioli C, Briskin D, Cheung DG, Bolon B, Anderlucci L, Alder H et al (2013) Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet* 9(3):e1003311
214. Li B, Lu Y, Wang H, Han X, Mao J, Li J, Yu L, Wang B, Fan S, Yu X et al (2016) miR-221/222 enhance the tumorigenicity of human breast cancer stem cells via modulation of PTEN/ Akt pathway. *Biomed Pharmacother* 79:93–101
215. Dentelli P, Traversa M, Rosso A, Togliatto G, Olgasi C, Marchio C, Provero P, Lembo A, Bon G, Annaratone L et al (2014) miR-221/222 control luminal breast cancer tumor progression by regulating different targets. *Cell Cycle* 13(11):1811–1826
216. Han L, Liu B, Jiang L, Liu J, Han S (2016) MicroRNA-497 downregulation contributes to cell proliferation, migration, and invasion of estrogen receptor alpha negative breast cancer by targeting estrogen-related receptor alpha. *Tumour Biol* 37(10):13205–13214
217. Stinson S, Lackner MR, Adai AT, Yu N, Kim HJ, O'Brien C, Spoerke J, Jhunjunwala S, Boyd Z, Januario T et al (2011) TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci Signal* 4(177):ra41

218. Hwang MS, Yu N, Stinson SY, Yue P, Newman RJ, Allan BB, Dornan D (2013) miR-221/222 targets adiponectin receptor 1 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *PLoS ONE* 8(6):e66502
219. Ye X, Bai W, Zhu H, Zhang X, Chen Y, Wang L, Yang A, Zhao J, Jia L (2014) MiR-221 promotes trastuzumab-resistance and metastasis in HER2-positive breast cancers by targeting PTEN. *BMB Rep* 47(5):268–273
220. Falkenberg N, Anastasov N, Schaub A, Radulovic V, Schmitt M, Magdolen V, Aubele M: Secreted uPAR isoform 2 (uPAR7b) is a novel direct target of miR-221 (2015) *Oncotarget* 6(10):8103–8114
221. Tavanafar F, Safaralizadeh R, Hosseinpour-Feizi MA, Mansoori B, Shanehbandi D, Mohammadi A, Baradaran B (2017) Restoration of miR-143 expression could inhibit migration and growth of MDA-MB-468 cells through down-regulating the expression of invasion-related factors. *Biomed Pharmacother* 91:920–924
222. Tang W, Yu F, Yao H, Cui X, Jiao Y, Lin L, Chen J, Yin D, Song E, Liu Q (2014) miR-27a regulates endothelial differentiation of breast cancer stem like cells. *Oncogene* 33(20):2629–2638
223. Jones R, Watson K, Bruce A, Nersesian S, Kitz J, Moorehead R (2017) Re-expression of miR-200c suppresses proliferation, colony formation and in vivo tumor growth of murine claudinlow mammary tumor cells. *Oncotarget* 8(14):23727–23749
224. Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, Xu CX, Permuth-Wey J, Lancaster JM, Coppola D, Sellers TA, Djeu JY et al (2014) Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triplenegative breast cancer. *Oncogene* 33(6):679–689
225. Hrdlickova R, Nehyba J, Bargmann W, Bose HR Jr (2014) Multiple tumor suppressor microRNAs regulate telomerase and TCF7, an important transcriptional regulator of the Wnt pathway. *PLoS ONE* 9(2):e86990
226. Jiang S, Zhang LF, Zhang HW, Hu S, Lu MH, Liang S, Li B, Li Y, Li D, Wang ED et al (2012) A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells. *EMBO J* 31(8):1985–1998
227. Eichner LJ, Perry MC, Dufour CR, Bertos N, Park M, St-Pierre J, Giguere V (2010) miR-378(\*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1beta/ERRgamma transcriptional pathway. *Cell Metab* 12(4):352–361
228. Serguienko A, Grad I, Wennerstrom AB, Meza-Zepeda LA, Thiede B, Stratford EW, Myklebost O, Munthe E (2015) Metabolic reprogramming of metastatic breast cancer and melanoma by let-7a microRNA *Oncotarget* 6(4):2451–2465
229. Favaro E, Ramachandran A, McCormick R, Gee H, Blancher C, Crosby M, Devlin C, Blick C, Buffa F, Li JL et al (2010) MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU. *PLoS ONE* 5(4):e10345
230. Tsukerman P, Stern-Ginossar N, Gur C, Glasner A, Nachmani D, Bauman Y, Yamin R, Vitenshtein A, Stanietsky N, Bar-Mag T et al (2012) MiR-10b downregulates the stress-induced cell surface molecule MICB, a critical ligand for cancer cell recognition by natural killer cells. *Cancer Res* 72(21):5463–5472
231. Shen J, Pan J, Du C, Si W, Yao M, Xu L, Zheng H, Xu M, Chen D, Wang S et al (2017) Silencing NKG2D ligand-targeting miRNAs enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity in breast cancer. *Cell Death Dis* 8(4):e2740
232. Dinami R, Ercolani C, Petti E, Piazza S, Ciani Y, Sestito R, Sacconi A, Biagioni F, le Sage C, Agami R et al (2014) miR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res* 74(15):4145–4156
233. Czochoch JR, Sulkowski P, Glazer PM (2016) miR-155 overexpression promotes genomic instability by reducing highfidelity polymerase delta expression and activating error-prone DSB repair. *Mol Cancer Res* 14(4):363–373

234. Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, Beech J, Kulshrestha R, Abdelmohsen K, Weinstock DM et al (2011) miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell* 41(2):210–220
235. Choi YE, Pan Y, Park E, Konstantinopoulos P, De S, D'Andrea A, Chowdhury D (2014) MicroRNAs down-regulate homologous recombination in the G1 phase of cycling cells to maintain genomic stability. *Elife* 3:e02445
236. Moazzeni H, Najafi A, Khani M (2017) Identification of direct target genes of miR-7, miR-9, miR-96, and miR-182 in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Cell Probes* 34:45
237. Xiang M, Birkbak NJ, Vafaizadeh V, Walker SR, Yeh JE, Liu S, Kroll Y, Boldin M, Taganov K, Groner B et al (2014) STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF-kappaB to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes. *Sci Signal* 7(310):ra11
238. Bahena-Ocampo I, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Lizarraga F, Campos-Arroyo D, Schwarz A, Garcia-Lopez P, Maldonado V, Melendez-Zajgla J (2016) miR-10b expression in breast cancer stem cells supports self-renewal through negative PTEN regulation and sustained AKT activation. *EMBO Rep* 17(7):1081
239. Luo Q, Li X, Gao Y, Long Y, Chen L, Huang Y, Fang L (2013) MiRNA-497 regulates cell growth and invasion by targeting cyclin E1 in breast cancer. *Cancer Cell Int* 13(1):95
240. Mandujano-Tinoco EA, Garcia-Venzor A, Munoz-Galindo L, Lizarraga-Sanchez F, Favela-Orozco A, Chavez-Gutierrez E, Krotzsch E, Salgado RM, Melendez-Zajgla J, Maldonado V:(2017) miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids. *Biochim Biophys Acta* 1864:1642
241. Pan Y, Li J, Zhang Y, Wang N, Liang H, Liu Y, Zhang CY, Zen K, Gu H (2016) Slug-upregulated miR-221 promotes breast cancer progression through suppressing E-cadherin expression. *Sci Rep* 6:25798
242. Gao S, Wang Y, Wang M, Li Z, Zhao Z, Wang RX, Wu R, Yuan Z, Cui R, Jiao K et al (2017) MicroRNA-155, induced by FOXP3 through transcriptional repression of BRCA1, is associated with tumor initiation in human breast cancer. *Oncotarget* 8:41451
243. Ivancich M, Schrank Z, Wojdyla L, Leviskas B, Kuckovic A, Sanjali A, Puri N (2017) Treating cancer by targeting telomeres and telomerase. *Antioxidants* 6(1):E15
244. Lei K, Du W, Lin S, Yang L, Xu Y, Gao Y, Xu B, Tan S, Xu Y, Qian X et al (2016) 3B, a novel photosensitizer, inhibits glycolysis and inflammation via miR-155-5p and breaks the JAK/STAT3/SOCS1 feedback loop in human breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* 82:141–150
245. Williams M, Cheng YY, Blenkiron C, Reid G:(2016) Exploring mechanisms of MicroRNA downregulation in cancer. *Microna* 6:2
246. Vincent K, Pichler M, Lee GW, Ling H (2014) MicroRNAs, genomic instability and cancer. *Int J Mol Sci* 15(8):14475–14491
247. Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR (2010) Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol* 4(3):255–266
248. Berton S, Cusan M, Segatto I, Citron F, D'Andrea S, Benevol S, Avanzo M, Dall'Acqua A, Schiappacassi M, Bristow RG et al (2017) Loss of p27kip1 increases genomic instability and induces radio-resistance in luminal breast cancer cells. *Sci Rep* 7(1):595
249. Duru N, Gernapudi R, Eades G, Eckert R, Zhou Q (2015) Epigenetic regulation of miRNAs and breast cancer stem cells. *Curr Pharmacol Rep* 1(3):161–169
250. Sun H, Ding C, Zhang H, Gao J (2016) Let7 miRNAs sensitize breast cancer stem cells to radiation-induced repression through inhibition of the cyclin D1/Akt1/Wnt1 signaling pathway. *Mol Med Rep* 14(4):3285–3292
251. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; 455: 64–71.

252. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769–773.
253. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455: 58–63.
254. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 175–205.
255. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92–105.
256. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642–655.
257. Davis BN, Hata A. Regulation of microRNA biogenesis: a miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* 2009; 7: 18.
258. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102–114.
259. Forman JJ, Legesse-Miller A, Collier HA. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 14879–14884.
260. Haussler J, Landthaler M, Jaskiewicz L, Gaidatzis D, Zavolan M. Relative contribution of sequence and structure features to the mRNA binding of Argonaute/EIF2C-miRNA complexes and the degradation of miRNA targets. *Genome Res* 2009; 19: 2009–2020.
261. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE et al. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol* 2009; 7: e1000238.
262. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318: 1931–1934.
263. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 228–234.
264. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415–419.
265. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051–4060.
266. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 2005; 24: 138–148.
267. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95–98.
268. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011–3016.
269. Ding XC, Weiler J, Grosshans H. Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. *Trends Biotechnol* 2009; 27: 27–36.
270. Bosse GD, Simard MJ. A new twist in the microRNA pathway: not Dicer but Argonaute is required for a microRNA production. *Cell Res* 2010; 20: 735–737.
271. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 22–32.
272. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 2006; 312: 75–79.
273. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005; 309: 1573–1576.
274. Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* 2003; 9: 112–123.
275. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 438–442.

276. Li WH, Gojobori T, Nei M. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* 1981; 292: 237–239.
277. Vanin EF. Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu Rev Genet* 1985; 19: 253–272.
278. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 2010; 465: 1033–1038.
279. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007; 129: 1311–1323.
280. Liu XH, Sun M, Nie FQ, Ge YB, Zhang EB, Yin DD et al. Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: 92.
281. Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA* 2014; 20:1829–1842.
282. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 2013; 495: 384–388.
283. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50: 298–301.
284. Hamam R, Ali AM, Alsaleh KA, Kassem M, Alfayez M, Aldahmash A et al. microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Sci Rep* 2016; 6: 25997.
285. Oikonomopoulos A, Polytarchou C, Joshi S, Hommes DW, Iliopoulos D. Identification of circulating microRNA signatures in Crohn's disease using the Nanostring nCounter technology. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22: 2063–2069.
286. Alajez NM, Shi W, Wong D, Lenarduzzi M, Waldron J, Weinreb I et al. Lin28b promotes head and neck cancer progression via modulation of the insulin-like growth factor survival pathway. *Oncotarget* 2012; 3: 1641–1652.
287. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 2012; 492: 376–381.
288. Quiat D, Olson EN. MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest* 2013; 123: 11–18.
289. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 704–714.
290. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S et al. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet* 2009; 41: 843–848.
291. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007; 131: 1109–1123.
291. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 2697–2706.
293. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004; 114: 569–581.
294. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117: 927–939.
295. Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, Keklikoglou I, Ward A, Uhlmann S et al. MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 633–651.
296. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449: 682–688.



297. Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, Liu CG, Palazzo JP et al. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J Pathol* 2009; 219: 214–221.
298. Rowland BD, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 11–23.
299. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 1026–1033.
300. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282: 14328–14336.
301. Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, Arisio R et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117: 131–140.
302. Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 2584–2595.
303. Schramedei K, Morbt N, Pfeifer G, Lauter J, Rosolowski M, Tomm JM et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene* 2011; 30: 2975–2985.
304. Png KJ, Yoshida M, Zhang XH, Shu W, Lee H, Rimner A et al. MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. *Genes Dev* 2011; 25: 226–231.
305. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; 451: 147–152.
306. Heyn H, Engelmann M, Schreek S, Ahrens P, Lehmann U, Kreipe H et al. MicroRNA miR-335 is crucial for the BRCA1 regulatory cascade in breast cancer development. *Int J Cancer* 2011; 129: 2797–2806.
307. Shi W, Gerster K, Alajez NM, Tsang J, Waldron L, Pintilie M et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 2926–2937.
308. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 497–505.
309. O'Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* 2010; 31: 961–967.
310. Szabo CI, King MC. Inherited breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 1995; 4 Spec No: 1811–1817.
311. Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y, Gu H et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res* 2010; 70: 3119–3127.
312. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13421–13426.
313. Li L, Yuan L, Luo J, Gao J, Guo J, Xie X. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin Exp Med* 2013; 13: 109–117.
314. Wu H, Zhu S, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res* 2009; 19: 439–448.
315. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T et al. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 2195–2200.
316. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 593–601.

317. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 423–433.
318. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654–659.
319. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 6328–6333.
320. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci* 2012; 37: 460–465.
321. Al-toub M, Vishnubalaji R, Hamam R, Kassem M, Aldahmash A, Alajezi NM. CDH1 and IL1- $\beta$  expression dictates FAK and MAPKK-dependent cross-talk between cancer cells and human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: 135.
322. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997–1006.
323. Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 2008; 3: e3148.
324. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10513–10518.
325. Chin LJ, Slack FJ. A truth serum for cancer—microRNAs have major potential as cancer biomarkers. *Cell Res* 2008; 18: 983–984.
326. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9: 513–521.
327. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Hussain MS et al. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2013; 73: 729–740.
328. Khoo SK, Petillo D, Kang UJ, Resau JH, Berryhill B, Linder J et al. Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease. *J Parkinson's Dis* 2012; 2: 321–331.
329. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; 112: 55–59.
330. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375–1381.
331. Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K et al. Downregulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS ONE* 2009; 4: e5532.
332. Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT et al. Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer. *Transl Oncol* 2010; 3: 109–113.
333. Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzese JL et al. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prevent Res* 2009; 2: 807–813.
334. Wong TS, Ho WK, Chan JY, Ng RW, Wei WI. Mature miR-184 and squamous cell carcinoma of the tongue. *Sci World J* 2009; 9: 130–132.
335. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T et al. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers* 2009; 14: 529–538.

336. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist* 2010; 15: 673–682.
337. Schwarzenbach H, Milde-Langosch K, Steinbach B, Muller V, Pantel K. Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 933–941.
338. Cuk K, Zucknick M, Madhavan D, Schott S, Golatta M, Heil J et al. Plasma microRNA panel for minimally invasive detection of breast cancer. *PLoS ONE* 2013; 8: e76729.
339. Wu X, Somlo G, Yu Y, Palomares MR, Li AX, Zhou W et al. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med* 2012; 10: 42.
340. Shen J, Hu Q, Schrauder M, Yan L, Wang D, Medico L et al. Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection. *Oncotarget* 2014; 5: 5284–5294.
341. Kodahl AR, Lyng MB, Binder H, Cold S, Gravgaard K, Knoop AS et al. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study. *Mol Oncol* 2014; 8: 874–883.
342. Zearo S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG et al. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer* 2014; 14: 200.
343. Shimomura A, Shiino S, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Matsuzaki J et al. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci* 2016; 107: 326–334.
344. Sochor M, Basova P, Pesta M, Dusilkova N, Bartos J, Burda P et al. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer* 2014; 14: 448.
345. Chan M, Liaw CS, Ji SM, Tan HH, Wong CY, Thike AA et al. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res* 2013; 19:4477–4487.
346. Matamala N, Vargas MT, Gonzalez-Campora R, Minambres R, Arias JI, Menendez P et al. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. *Clin Chem* 2015; 61: 1098–1106.
347. Li XX, Gao SY, Wang PY, Zhou X, Li YJ, Yu Y et al. Reduced expression levels of let-7c in human breast cancer patients. *Oncol Lett* 2015; 9: 1207–1212.
348. Wang PY, Gong HT, Li BF, Lv CL, Wang HT, Zhou HH et al. Higher expression of circulating miR-182 as a novel biomarker for breast cancer. *Oncol Lett* 2013; 6: 1681–1686.
349. Waters PS, Dwyer RM, Brougham C, Glynn CL, Wall D, Hyland P et al. Impact of tumour epithelial subtype on circulating microRNAs in breast cancer patients. *PLoS ONE* 2014; 9: e90605.
350. Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2009; 2: 89.
351. Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 586–593.
352. Joosse SA, Muller V, Steinbach B, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer* 2014; 111: 909–917.
353. Mangolini A, Ferracin M, Zanzi MV, Saccenti E, Ebnaof SO, Poma VV et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. *Biomark Res* 2015; 3: 12.
354. Kleivi Sahlberg K, Bottai G, Naume B, Burwinkel B, Calin GA, Borresen-Dale AL et al. A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 1207–1214.

355. Chen W, Cai F, Zhang B, Barekati Z, Zhong XY. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumour Biol* 2013; 34: 455–462.
356. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R90.
357. Shaker O, Maher M, Nassar Y, Morcos G, Gad Z. Role of microRNAs -29b-2, -155, -197 and -205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. *Gene* 2015; 560: 77–82.
358. Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, Chen S, Wang H et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 223–229.
359. Huo D, Clayton WM, Yoshimatsu TF, Chen J, Olopade OI. Identification of a circulating MicroRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients. *Oncotarget* 2016; ;7: 55231–55248.
360. Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin Chem* 2013; 59: 1489–1496.
361. Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS ONE* 2012; 7: e34210.
362. Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS ONE* 2012; 7: e47003.
363. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clin Chem* 2015; 61: 56–63.
364. Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS ONE* 2012; 7: e41561.
365. Diener Y, Walenda T, Jost E, Brummendorf TH, Bosio A, Wagner W et al. MicroRNA expression profiles of serum from patients before and after chemotherapy. *Genomics Data* 2015; 6: 125–127.
366. Hansen TF, Carlsen AL, Heegaard NH, Sorensen FB, Jakobsen A. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015; 112: 624–629.
367. Ponomaryova AA, Morozkin ES, Rykova EY, Zaporozhchenko IA, Skvortsova TE, Dobrodeev capital AC et al. Dynamic changes in circulating miRNA levels in response to antitumor therapy of lung cancer. *Exp Lung Res* 2016; 42: 95–102.
368. Li Y, Kowdley KV. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem* 2012; 431: 69–75.
369. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 197–208.
370. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 13–21.
371. Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009; 138: 592–603.
372. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; 283: 14910–14914

